ZUR ROLLE DES REDUZIERTEN GLUTATHIONS LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE BEI DER SEKRETION VON INSULIN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Roslindis EUJEN
aus Nürnberg

1979

ZUR ROLLE DES REDUZIERTEN GLUTATHIONS LANGERHANSSCHER INSELN DER RATTE BEI DER SEKRETION VON INSULIN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Roslindis EUJEN
aus Nürnberg

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 1979

Dekan: Prof. Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Auterhoff

Meinen Eltern
und Enno
gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0042

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1976 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im März 1979 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für zahlreiche Anregungen, freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für ständige Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit herzlich bedanken.

Abkürzungen

t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
p-CMB	para-Chlormercuribenzoat
CPDS	Bis-(5-carboxy-2-pyridyl)disulfid
DIP	Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)
DIP+2 = DIP-Salz	Dijodsalz des Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methyl-piperazids)
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
MB	Methylenblau
MPA	Metaphosphorsäure
µE	Mikroeinheiten
µM	mikromolar
µmol	Mikromol
mM	millimolar
mmol	Millimol
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
NEM	N-Äthylmaleinimid
n.s.	nicht signifikant
OPT	ortho-Phthaldialdehyd
P	Probability
pM	picomolar

pmol	Picomol
PPS	Pentosephosphatshunt
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard Error of the Mean = Mittlerer Fehler des Mittelwertes

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.2	Aufgabenstellung	8
1.2.1	Membranständige SH-Gruppen, GSH/GSSG-Quotient und Insulinsekretion	8
1.2.1	Leucin und GSH/GSSG-Quotient	11
1.2.3	Alter und GSH/GSSG-Quotient	13
2.	Material und Methoden	15
2.1	Versuchstiere	15
2.2	Geräte	15
2.3	Chemikalien und Enzyme	16
2.4	Synthese der DIP-Verbindungen	16
2.4.1	Synthese und Analytik von DIP	17
2.4.1.1	Synthese von DIP	17
2.4.1.2	Elementaranalyse von DIP	18
2.4.1.3	IR - Spektrum von DIP	18
2.4.1.4	Massenspektrum von DIP	19
2.4.1.5	NMR - Spektrum von DIP	20
2.4.2	Synthese und Analytik von DIP+2	21
2.4.2.1	Synthese von DIP+2	21
2.4.2.2	Elementaranalyse von DIP+2	22
2.4.2.3	IR - Spektrum von DIP+2	22
2.4.2.4	Massenspektrum von DIP+2	23
2.4.2.5	NMR - Spektrum von DIP+2	24

2.4.3	Stabilitätsuntersuchungen	25
2.4.4	Reaktion von DIP und DIP+2 mit reduziertem Glutathion in vitro	26
2.5	Elektrolytlösungen	29
2.5.1	Hanks' - Lösung	29
2.5.2	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	29
2.5.3	Inkubationslösungen	30
2.6	Experimenteller Teil	32
2.6.1	Isolierte Langerhanssche Inseln	32
2.6.1.1	Operation	32
2.6.1.2	Präparation der Langerhansschen Inseln	32
2.6.1.3	Vorinkubation	34
2.6.1.4	Hauptinkubation	34
2.6.2	Meßmethoden	36
2.6.2.1	Insulinbestimmung	36
2.6.2.2	Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion	38
2.6.3	Versuchsauswertung	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Einfluß von DIP und DIP+2 auf reduziertes und oxidiertes Glutathion, GSH/GSSG-Quotienten und Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte	44
3.1.1	Einfluß von DIP und DIP+2 auf den GSH- und GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Pankreasinseln der Ratte	44

3.1.2	Einfluß von DIP und DIP+2 auf die Glucose induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte	59
3.1.3	Einfluß von DIP und DIP+2 auf die durch p-CMB induzierte Insulinsekretion isolierter Inseln	74
3.2	Einfluß von Leucin auf den GSH und GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Inseln	79
3.3	Einfluß des Alters auf den GSH-und GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte	82
3.3.1	Stimulation mit Glucose	82
3.3.2	Stimulation mit Leucin	88
4.	Diskussion	93
4.1	Membranständige SH-Gruppen, intrazellulärer GSH/GSSG-Quotient und Insulinsekretion	93
4.2	Leucin und GSH/GSSG-Quotient	108
4.3	Alter und GSH/GSSG-Quotient	111
5.	Zusammenfassung	114
6.	Literaturverzeichnis	117

1. E I N L E I T U N G

1.1 Stand der Forschung

Bis heute ist der Mechanismus, über den die Glucose und andere Stimulatoren die Langerhanssche Insel zum Austritt von Insulin aus der ß-Zelle veranlassen, nicht geklärt. In letzter Zeit wurde neben dem Metabolismus der Glucose über den Glycolyseweg auch ihrem Abbau im Pentose-Phosphat-Shunt (PPS) eine Bedeutung für den Mechanismus der Glucose induzierten Insulinsekretion zugemessen. Für diese These sprechen folgende Argumente:

1. Montague und Taylor konnten nachweisen, daß Ribosen die Insulinfreisetzung stimulieren (1). C-5-Körper können aber nicht über die Glycolyse metabolisiert werden, sie werden in erster Linie über den PPS abgebaut.
2. Inseln fötaler Ratten reagieren auf einen Glucosereiz hin nicht mit einer Sekretion von Insulin, erst nach ein bis zwei Tagen erfolgt die Ansprechbarkeit gegenüber Glucose. Die fötalen Inseln können Glucose nur über die Glycolyse, nicht über den PPS verstoffwechseln (2).
3. Hemmt man den PPS in isolierten Inseln selektiv mit 6-Aminonicotinamid, einem Antimetaboliten der NAD- bzw. NADP-Synthese, so läßt sich eine verminderte Stimulierbarkeit der ß-Zelle durch Glucose nachweisen.(3).
4. Wie in unserem Labor kürzlich gezeigt werden konnte, hängt der prozentuale Anteil des PPS an der Glucoseoxida-

tion von der Glucosekonzentration ab, d.h. je höher die Glucosekonzentration, desto mehr Glucose wird über den PPS verstoffwechselt, bis zu 10-12 % (4,5); Voraussetzung ist allerdings, daß sich Insulin während des Experiments nicht im Medium anhäuft, da dies selbst die Eigenschaft hat, den PPS zu hemmen (6). Eine solche Situation finden wir jedoch praktisch nur in vitro bei längerer Inkubation , sowie möglicherweise in vivo unter den Bedingungen maximaler Stimulation.

Die Frage nach der oder den Aufgaben des PPS im Sekretionsmechanismus wird dahingehend diskutiert, daß über diesen Stoffwechselweg nicht unbeträchtliche Mengen an NADPH gebildet werden, das seinerseits eine Rolle im Sekretionsmechanismus spielen könnte. Für eine solche Rolle sprechen Befunde von Ammon und Steinke, die 1973 zeigten, daß bei Zusatz von Methylenblau, einem Farbstoff, der in geeigneten Konzentrationen selektiv NADPH zu NADP oxidiert, der NADPH/NADP-Quotient dosisabhängig abnimmt. Gleichzeitig mit dieser Abnahme geht eine verminderte Stimulierbarkeit der Insulinsekretion durch Glucose einher (7).

Andererseits ist auch der NADPH/NADP-Quotient - ebenso wie der PPS und die Sekretion von Insulin - abhängig von der Glucosekonzentration, d.h. je höher die Glucosekonzentration, desto mehr steigt der NADPH/NADP-Quotient (8).

Von anderen Organen, z.B. von Erythrocyten, weiß man, daß eine wichtige Aufgabe des NADPH darin besteht, als Wasser-

stoffdonator einen gewissen Spiegel an reduziertem Glutathion (GSH) durch folgende Reaktion aufrecht zu erhalten:

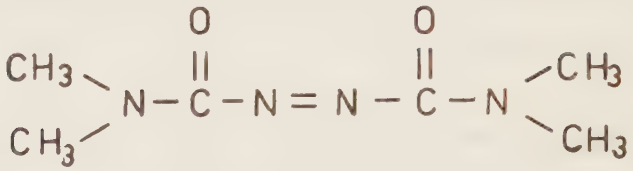
$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightleftharpoons[\text{Reductase}]{\text{Glutathion}} 2\,GSH + NADP^+$$

Reduziertes Glutathion hat allgemein die Aufgabe, empfindliche SH-Proteine vor Oxidation zu schützen. In der ß-Zelle könnte seine Aufgabe darin bestehen, SH-Gruppen, die für den Sekretionsmechanismus von Bedeutung sind, in reduziertem Zustand zu halten. Solche SH-Gruppen sind möglicherweise auch Bestandteil von Rezeptoren in der Membran der ß-Zelle, die für die Bindung oder "intrinsic activity" von Insulin freisetzenden Stimuli erforderlich sind, oder aber Bestandteil von Substanzen (Enzymen) der ß-Zelle, die am Sekretionsmechanismus beteiligt sind.

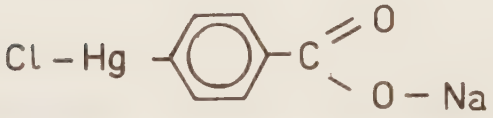
Im Zuge dieser Hypothese sind eine ganze Reihe sogenannter Thiolreagenzien, also Stoffe, die in der Lage sind, das GSH/GSSG-Gleichgewicht zu beeinflussen, eingesetzt worden, um die Bedeutung von SH-Gruppen bei der Sekretion von Insulin aufzuklären.

In diesem Zusammenhang sind Diamid (Diazodiameisensäure-bis-N,N-Dimethylamid)und p-CMB (para-Chlormercuribenzo-

at) von besonderem Interesse:

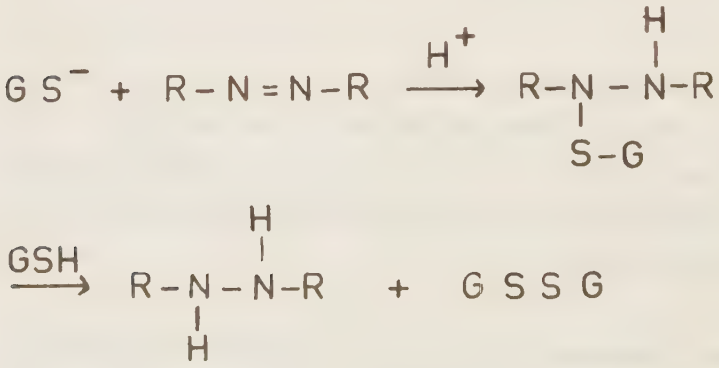


DIAMID



para-Chlormercuribenzoat

Kosower und Mitarbeiter fanden, daß Azodicarbonsäureester der allgemeinen Struktur R-N-CO-N=N-CO-N-R geeignet sind, das GSH/GSSG-Gleichgewicht in biologischen Systemen zu beeinflussen, und zwar nach folgender Gleichung (9):

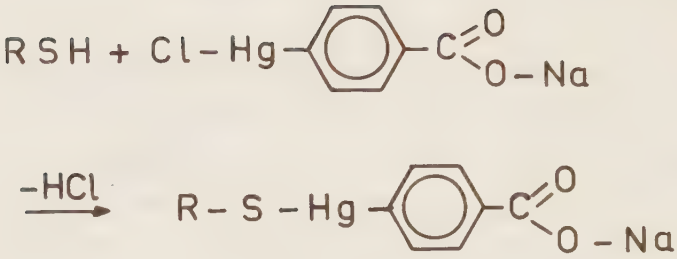


Auch Diamid oxidiert in geeigneten Konzentrationen GSH zum Disulfid GSSG (10,11), von Brown wurde gezeigt, daß die Azoverbindung die Zellmembran zu passieren vermag (12).

Aus der chemischen Reaktivität der Azoester schließt Kosower, daß saure, kleine Moleküle mit SH-Gruppen leichter oxidiert werden als Protein-SH-Gruppen, die im allgemeinen weniger sauer und sterisch gehindert sind (11). Demnach kommt Glutathion als relativ kleines Molekül am ehesten als Reaktionspartner der Azoester in Frage.

Ammon et al. konnten nachweisen, daß durch Diamid die Glucose induzierte Insulinsekretion gehemmt (13) und der GSH/GSSG-Quotient der Pankreasinseln von Ratten gesenkt wird(14).

Von Hellman und Mitarbeitern wurde postuliert, daß für die Sekretion von Insulin das Vorhandensein von freien SH-Gruppen in der Membran der ß-Zelle Voraussetzung ist. Diese Hypothese stützt sich unter anderem darauf, daß mit para-Chlormercuribenzoat, einem Thiolreagenz, welches nach unten stehender Gleichung zur Mercaptidbildung führt, jedoch als Salz infolge seiner hydrophilen Eigenschaften nicht in der Lage ist, die Lipoidbarriere der ß-Zellmembran zu überwinden , eine Sekretion von Insulin ausgelöst werden kann(15).

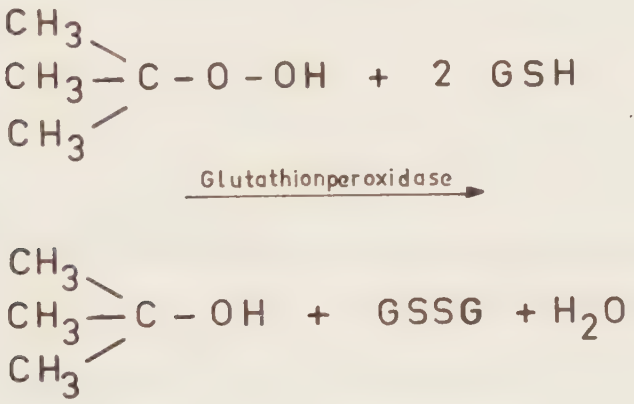


Durch Methylenblau, das - wie erwähnt- den Gehalt der Langerhansschen Insel an NADPH durch Oxidation zu NADP herabsetzt, wird diese Wirkung von p-CMB ebenfalls gehemmt (13).

Auch wenn man am Modell des isoliert-perfundierten Rattenpankreas den intrazellulären Gehalt an SH-Gruppen durch Diamid senkt, ist p-CMB nicht mehr in der Lage, die Glucose induzierte Insulinsekretion zu stimulieren (13).

Eine weitere Möglichkeit, den intrazellulären Gehalt an SH-Gruppen herabzusetzen - und zwar durch einen völlig anderen Mechanismus - ergibt sich durch den Einsatz eines weiteren pharmakologischen Hilfsstoffs, nämlich t-BHP (tertiäres Butylhydroperoxid):

Nach Untersuchungen an Erythrocyten und Leberzellen von Srivastava und Sies (16,17) fungiert t-BHP als Substrat der Glutathionperoxidase und führt dadurch reduziertes GSH in oxidiertes GSSG über:



Auch bei Anwesenheit von t-BHP wird sowohl der GSH/GSSG-Quotient der Pankreasinsel gesenkt (14), als auch die Insulin freisetzende Wirkung von Glucose und p-CMB gehemmt (13).

Die Bedeutung des intrazellulären GSH/GSSG-Systems erfuhr eine weitere Bestätigung durch die Befunde, daß auch die Glucose induzierte Insulinsekretion von einem Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten begleitet ist und zwischen Glucosekonzentration und Höhe des GSH/GSSG-Quotienten eine deutliche Korrelation besteht (8).

All diese Befunde unterstützen die These, daß Thiolgruppen in der Membran der ß-Zelle über die Kette PPS ⟶ NADPH ⟶ GSH ⟶ Membran-SH in reduziertem Zustand gehalten werden, und daß diese Aufrechterhaltung reduzierter Membran-SH-Gruppen Voraussetzung für eine Stimulierbarkeit der Sekretion von Insulin ist.

1.2 Aufgabenstellung

1.2.1 Membranständige SH-Gruppen, GSH/GSSG-Quotient und Insulinsekretion

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ganz spezifisch zwischen intrazellulärer und extrazellulärer SH-Gruppenoxidation zu unterscheiden und diese in Beziehung zur Glucose induzierten Insulinsekretion zu setzen, da zumindest für Diamid nicht gesichert ist, ob es nicht auch direkt membranständige SH-Gruppen oxidiert hat.

Um die Bedeutung des intrazellulären GSH für den Redoxzustand membranständiger SH-Gruppen und die Insulinsekretion näher kennenzulernen, wurde folgender Weg gewählt:
Es sollte mit Hilfe eines pharmakologischen Hilfsstoffs, der in der Lage ist, GSH in GSSG zu überführen, untersucht werden, ob mit ihm die Glucose und p-CMB induzierte Sekretion gehemmt werden kann, und zwar dann, wenn man

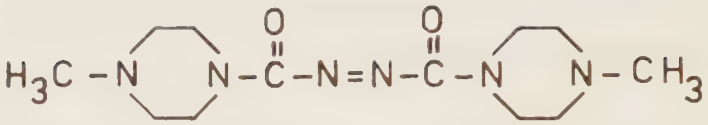
ihn so konstruiert, daß er einmal die Zellmembran passieren kann (also ungeladen und lipophil), zum anderen die Zellmembran nicht passieren kann (also als hydrophiles Salz). In letzterem Fall dürfte bei spezifischer Oxidation der SH-Gruppen des GSH keine Hemmung der Insulinsekretion stattfinden.

Im Falle der Aminoazoester, die -wie beschrieben- den Gehalt an intrazellulären SH-Gruppen herabsetzen, bietet sich für die Überführung in ein hydrophiles Salz die Quarternisierung des Aminstickstoffs, z.B. mit Methyljodid, an. Beim Diamid gelingt diese Reaktion jedoch nicht, da der Stickstoff der Dimethylaminogruppe infolge des Elektronenzuges der benachbarten Carbonylgruppe zu wenig basisch ist, um eine Methylgruppe an das freie Elektronenpaar anzulagern.

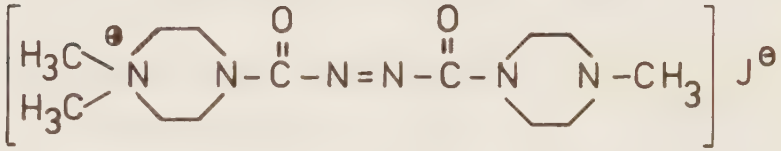
Kosower und Mitarbeiter beschreiben eine andere Gruppe von Thiolreagenzien, ebenfalls Azodicarbonsäureverbindungen, die geeignet sind, zu unterscheiden, ob bei biologischen Prozessen eine intra- oder extrazelluläre SH-Oxidation von Bedeutung ist (18).

Es handelt sich dabei um Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)(abgekürzt DIP) und die entsprechend quarternisierten Verbindungen, die als Jodsalze vorliegen (abgekürzt DIP+1 und DIP+2). Zur Strukturformel vergleiche Seite 10.

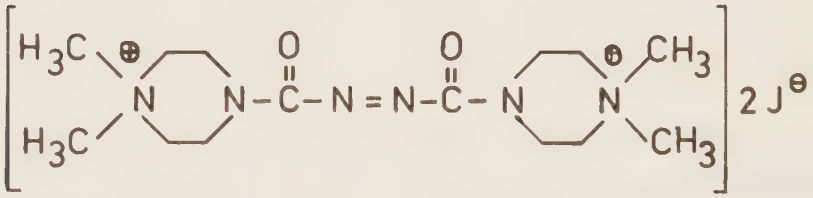
Der Stickstoff der DIP-Verbindung ist infolge der benach-



DIAZODICARBONSÄURE - BIS (N'-METHYLPIPERAZID)
= DIP



DIP+1



DIP + 2
= DIP - Salz

barten CH_2-Gruppen basisch genug, um in die quartäre Verbindung DIP+2 überführt werden zu können.

Auch DIP oxidiert intrazelluläres GSH zu GSSG, die quarternisierten Jodsalze führen in Erythrocyten jedoch zu keiner Veränderung des intrazellulären GSH-Gehalts (18). Und obwohl die DIP-Verbindungen gegenüber Glutathion wesentlich reaktiver sind als Diamid, werden sonstige Zellfunktionen nicht beeinflußt, Kosower fand beispielsweise keine Oxidation von Hämoglobin-SH-Gruppen in Erythrocyten(18).

In der vorliegenden Arbeit ging es zunächst darum, eine geeignete Synthese für die genannten Verbindungen zu finden, sie zu reinigen, zu analysieren und auf Haltbarkeit in Lösung zu untersuchen.

Dann wurde ihr Einfluß auf die durch Glucose und p-CMB induzierte Insulinsekretion und den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte untersucht.

1.2.2 Leucin und GSH/GSSG-Quotient

Von verschiedener Seite ist gezeigt worden, daß auch die Aminosäure Leucin mit der Insulinsekretion in Zusammenhang steht (19-22). So ist Leucin einerseits in der Lage, in Abwesenheit von Glucose die Insulinsekretion zu stimulieren (23,24), andererseits wird die Glucosewirkung auch synergistisch beeinflußt; bei Anwesenheit substimulatorischer

Glucosemengen (5,6 mM) bewirken 10 mM Leucin einen signifikanten Anstieg sezernierten Insulins (24,25).

Leucin wird in der ß-Zelle vollständig verstoffwechselt (26), und auch durch die Leucinmetaboliten α-Ketoisocapronsäure, Acetoacetat und Hydroxibutyrat läßt sich eine gesteigerte Sekretion nachweisen (27,28,25).

Leucin ist nicht in der Lage, den Glucoseabbau über den Embden- Meyerhof-Weg zu beeinflussen (29), ob Leucin die Aktivität des PPS steigert, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Folgende Befunde sprechen jedoch dafür, daß zumindest dem NADPH eine Bedeutung bei der Insulin freisetzenden Wirkung des Leucins zukommt:

- Der NADPH/NADP-Quotient isolierter Langerhansscher Inseln war in Gegenwart von 10 mM Leucin deutlich gesteigert (30).
- Die stimulierende Wirkung von p-CMB wurde am Modell des isoliert-perfundierten Rattenpankreas durch Leucin synergistisch beeinflußt (31).
- Diamid, Methylenblau und t-BHP hemmen auch die durch Leucin hervorgerufene Insulinsekretion (32).
- Exogenes Insulin, das auch den NADPH/NADP-Quotienten senkt (5), hemmt gleichfalls die stimulierende Wirkung des Leucins(33).

In diesem Zusammenhang war es ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkung des Leucins auf den insulären

GSH- und GSSG-Stoffwechsel zu untersuchen.

1.2.3 Alter und GSH/GSSG-Quotient

Weitere Untersuchungen sollten einen möglichen Zusammenhang zwischen der altersphysiologischen Verminderung der Insulinsekretion und dem GSH/GSSG-Quotienten klären.

Es ist bekannt, daß sich mit zunehmendem Alter die Glucoseutilisation verschlechtert und daß dies die Folge einer geringeren Sekretion von Insulin ist, was entweder durch ein Defizit der ß-Zelle an Insulin oder durch eine Störung im Sekretionsmechanismus bedingt sein kann.

Die Glucosetoleranz ist bei alten Ratten im Vergleich zu jungen Tieren deutlich herabgesetzt (34). An Collagenase-isolierten Mäuseinseln wurde 1974 von Ammon gezeigt, daß die Inseln zwei Jahre alter Mäuse auf den gleichen Glucosereiz hin weit weniger Insulin sezernieren (35). Diese Befunde konnten auch an vergleichenden Untersuchungen an Pankreasinseln alter und junger Ratten bestätigt werden (36,37).

Diese Abnahme der Ansprechbarkeit der ß-Zelle auf einen Glucosereiz ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht die Folge einer verminderten Verfügbarkeit an Insulin, da sich weder bei den Mäuseinseln noch bei den Ratteninseln ein Unterschied im Insulingehalt zwischen den Inseln junger und alter Tiere fand (35,37).

Die $^{14}CO_2$-Produktion aus ^{14}C-Glucose lag bei den Inseln alter Mäuse signifikant niedriger als bei jungen Tieren, was auf eine verminderte Glucoseoxidation schließen läßt, die alten Tiere antworteten auch im Gegensatz zu den jungen nicht mit einem NADPH-Anstieg auf einen Glucosereiz (35).

Es sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden, ob auch der GSH/GSSG-Stoffwechsel der Langerhansschen Ratteninsel altersbedingten Veränderungen unterliegt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet, die Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum erhielten. Das Körpergewicht der Tiere betrug zwischen 200 und 350 g. Die Haltung erfolgte in einem temperatur- (24^{o}) und lichtkontrollierten Raum. Die Tiere hatten ein Alter zwischen 3 und 5 Monaten.

Für die vergleichenden Untersuchungen alter und junger Ratten wurden Tiere beiderlei Geschlechts mit einem Alter von 3 Monaten und zwei Jahren, die unter den oben angegebenen Bedingungen gehalten worden waren, verwendet.

2.2 Geräte

Stereomikroskop Nikon SM6
Schüttelwasserbad, Firma Köttermann
Christ - Kühlzentrifuge UJ II KS
Kühlzentrifuge Cryofuge 20-30 mit Rotor Nr. 8760/32x12 ml
Fluorimeter: Fluoripoint der Firma Baird Atomic
Doppelstrahlspektralphotometer Beckmann DB-ST
Gefriertrocknungsanlage der Firma Christ Beta
Gamma - Zähler Nuclear Chicago
Olivetti - Tischcomputer P 602

Ultraschallbad Econoclean

Beckmann pH-Meter H 5

Whirl-Mix

2.3 Chemikalien und Enzyme

Collagenase (126-196 µE/mg)	Worthington Biochem. Corp. Freehold USA
α-D-Glucose	Serva Heidelberg
Insulin Radioimmunoassay Kit INSIK^{R}	Isotopendienst West, Sprendlingen
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Glutathion, reduziert	Boehringer, Mannheim
Glutathion, oxidiert	Boehringer, Mannheim
N-Äthylmaleinimid	Serva Heidelberg
o-Phthaldialdehyd	Sigma Corp., USA
p-Chlormercuribenzoat	Merck-Schuchardt, München
Ratteninsulin	Novo Lab.,Kopenhagen
Insulinantikörper	Novo Lab.,Kopenhagen

Alle anderen, nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4 Synthese der DIP-Verbindungen

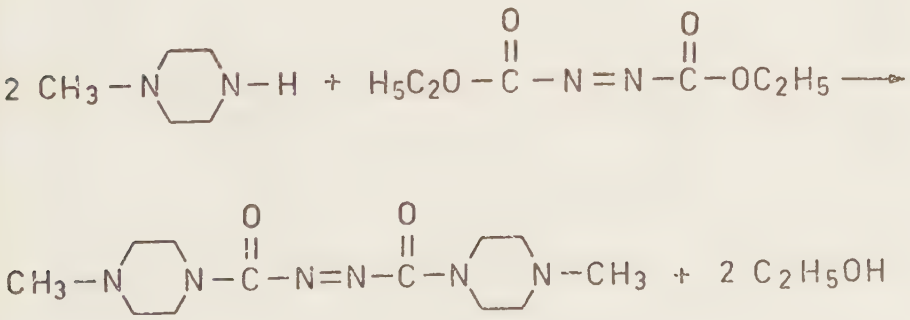
Da diese Verbindungen nicht im Handel erhältlich sind, wur-

den sie synthetisiert in Anlehnung an eine Methode von E.M. Kosower und H. Kanety-Londner (35).

2.4.1 Synthese und Analytik von DIP

2.4.1.1 Synthese von DIP

22,75 g N-Methylpiperazin (1 Äquivalent, leichter Überschuss) wurde unter Rühren bei 2^{o} langsam zu einer Lösung von 18,9 g (0,5 Äquivalente) Azodicarbonsäurediäthylester in Petroläther/Äther 3:1 getropft. Nach 2-stündigem Rühren wurde der entstandene gelbe Niederschlag abfiltriert, mit absolutem Äther nachgewaschen und aus n-Hexan/Benzol umkristallisiert.
Schmelzpunkt: 142^{o} (Kofler Heiztischmikroskop, unkorrigiert)
Ausbeute: 58 %
Reaktionsverlauf :



2.4.1.2 Elementaranalyse von DIP

Sie wurde in den Mikroanalytischen Laboratorien der Firma Ilse Beetz, Kronach durchgeführt und ergab folgende Werte:

$C_{12}H_{22}O_2N_6$ (282,3)

Berechnet:	C	51,06	H	7,87	N	29,78	O 11,34
Gefunden:	C	51,19	H	7,88	N	29,72	O 11,21

2.4.1.3 IR - Spektrum von DIP

Das Infrarotspektrum von DIP zeigt Banden im Bereich von 2980 cm^{-1} bis 2880 cm^{-1}, sowie zwischen 1470 cm^{-1} und 1440 cm^{-1}, die den CH_2-Valenzschwingungen bzw. den CH_2- und CH_3-Deformationsschwingungen zugeordnet werden können. Die Bande bei 2830 cm^{-1} ist charakteristisch für tertiäre Amine, die Carbonylbande erscheint bei 1710 cm^{-1}.

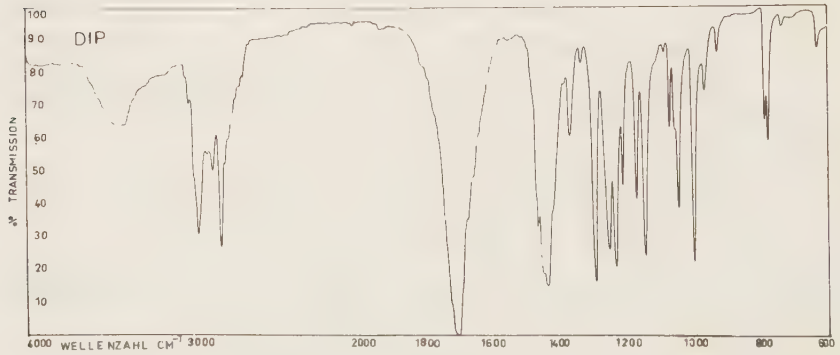
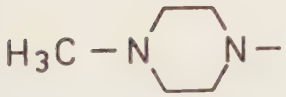


Abb. 1 IR-Spektrum von DIP

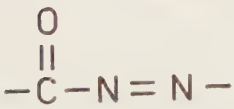
2.4.1.4 Massenspektrum von DIP

Der Molekularpeak erscheint bei 284 m/e, wobei zu berücksichtigen ist, daß der Stickstoff in protonierter Form vorliegen kann, so daß Massenzahlen erhalten werden, die um 1 oder 2 über dem erwarteten Wert (282) liegen.

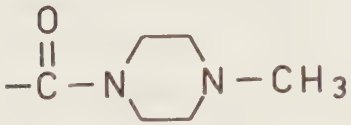
Die Peaks mit den Massenzahlen 56, 99 und 127 können folgenden Bruchstücken zugeordnet werden:



MZ 99



MZ 56



MZ 127

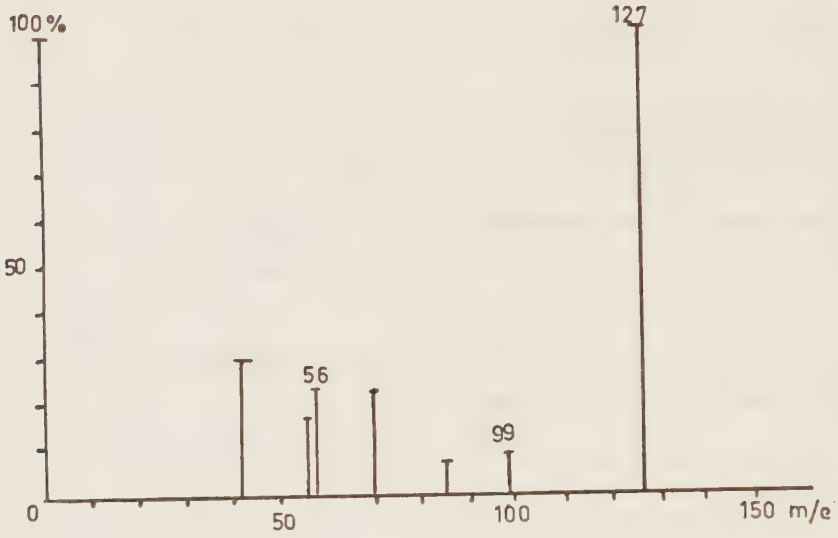


Abb. 2 Massenspektrum von DIP

2.4.1.5 NMR -Spektrum von DIP

Das Kernresonanzspektrum von DIP zeigt, daß die Substanz symmetrische Eigenschaften aufweist, die beiden Methylgruppen erscheinen bei identischem Feld (2,30 ppm) als Singulett. Die der Carbonylgruppe näherstehenden Piperazinprotonen werden durch diese entschirmt und treten bei tieferem Feld, nämlich 3,75 ppm in Resonanz. Die restlichen vier Protonen des Piperazinrings erfahren lediglich eine geringfügige Tieffeldverschiebung durch den -I-Effekt des benachbarten Heteroatoms. Die Multiplizität erklärt sich durch die Kopplung mit den magnetisch inäquivalenten Nachbarprotonen. Bei tiefstem Feld tritt noch die Resonanz von HOD auf. Die Integration der Substanzsignale entspricht dem theoretisch erwarteten Wert.

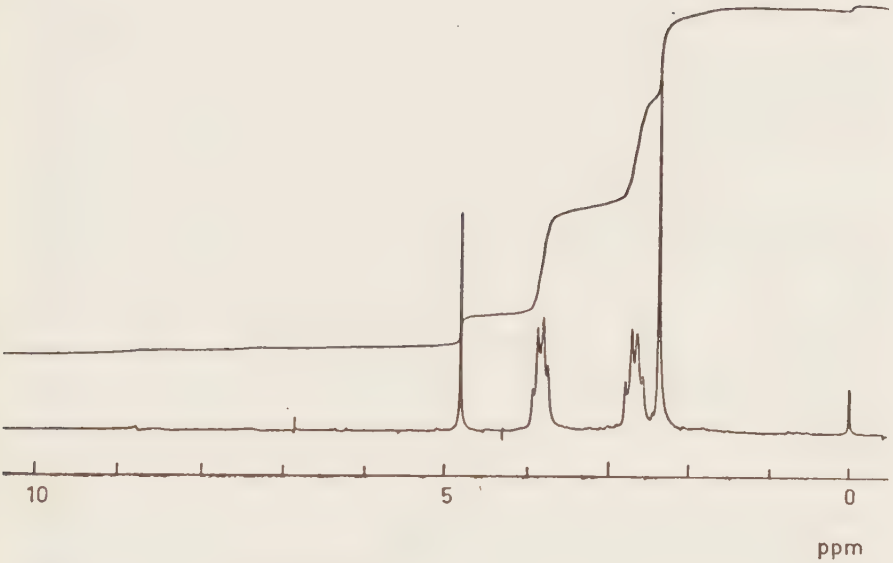


Abb. 3 MNR - Spektrum von DIP

2.4.2 Synthese und Analytik von DIP+2 (DIP-Salz)

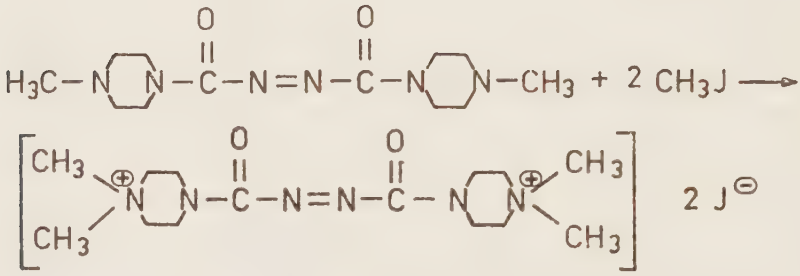
2.4.2.1 Synthese von DIP+2

3,75 g (1 Äquivalent) DIP und 15 g (4 Äquivalente) Methyljodid als Quarternisierungsmittel wurden für sich im doppelten Volumen Acetonitril gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt, eine Stunde stehen gelassen und anschließend noch 30 Minuten unter Rückfluß auf dem Wasserbad erwärmt. Das quartäre Salz schied sich direkt ab und wurde abgesaugt.
Zur Reinigung wurde das Reaktionsprodukt in möglichst wenig Wasser gelöst und in 99 %igem Äthanol wieder ausgefällt.

Schmelzpunkt: 262° (Kofler-Heiztischmikroskop, unkorrigiert)

Ausbeute: 57 %

Reaktionsverlauf:



2.4.2.2 Elementaranalyse von DIP+2

Sie wurde in den Mikroanalytischen Laboratorien der Firma Ilse Beetz, Kronach, durchgeführt und ergab folgende Werte:

$C_{14}H_{28}N_6O_2J_2$ (566,2)

Berechnet:	C	29,68	H	4,94	N	14,84	O	5,56	J	44,84
Gefunden :	C	29,79	H	4,96	N	14,84	O	5,57	J	44,74

2.4.2.3 IR - Spektrum von DIP+2

Die Banden zwischen 3040 cm^{-1} und 2900 cm^{-1} können den CH_2- und CH_3-Valenzschwingungen zugeordnet werden, bei 1710 cm^{-1} erscheint die Carbonylgruppe. Die bei DIP vorhandene ($N-CH_2$) Bande, charakteristisch für tertiäre Amine, tritt beim DIP-Salz nicht mehr auf. Daraus darf geschlossen werden, daß die Salzbildung am basischen Piperazinstickstoff stattgefunden hat.

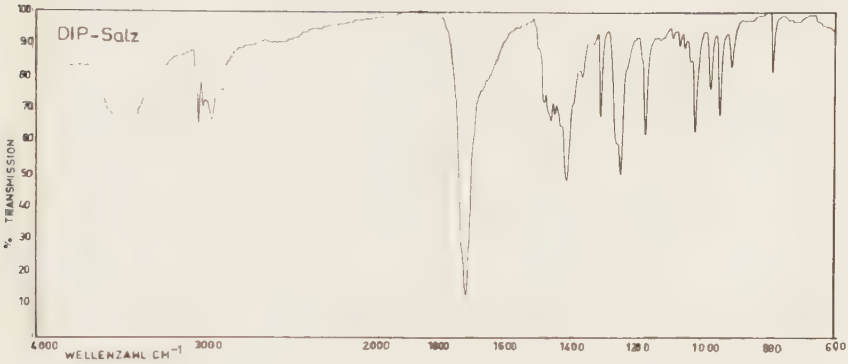
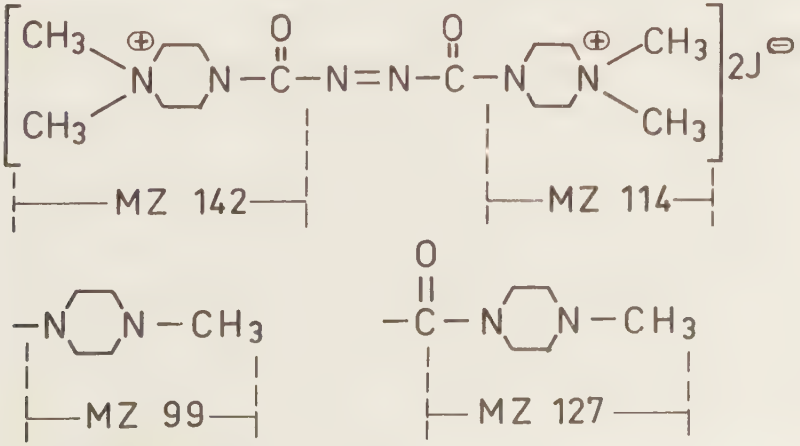


Abb.4 IR - Spektrum von DIP+2

2.4.2.4 Massenspektrum von DIP+2

Das Massenspektrum von DIP+2 zeigt Peaks mit den Massenzahlen 99, 114 127 und 142, die man nachstehenden Molekülbruchstücken zuordnen kann:



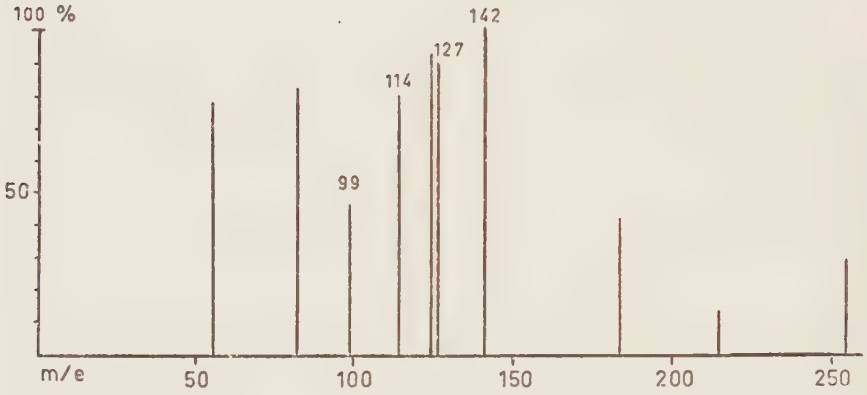


Abb.5 Massenspektrum von DIP+2

2.4.2.5 NMR-Spektrum von DIP+2

Im Kernresonanzspektrum der Substanz wird wieder der symmetrische Bau deutlich. Die vier N-Methylgruppen treten durch die positive Ladung des N-Atoms um etwa ein ppm stärker als normal tieffeldverschoben bei 3,75 ppm als Singulett in Resonanz. Die Piperazinprotonen werden ebenfalls durch die Ladung an dem einen Stickstoffatom unterschiedlich verschoben. Die dem positiv geladenen Stickstoffatom benachbarten Protonen werden entschirmt und treten als schlecht aufgelöstes Multiplett bei 4,35 ppm in Resonanz. Deutlich erkennbar ist die Kopplung, die das Signal der restlichen beiden Piperazinprotonen aufweist: Durch die chemisch inäquivalenten Nachbarprotonen resultiert als Resonanzsignal das Doppeldublett bei 3,88 ppm. Das intensive Resonanzsignal von HOD erscheint bei 4,96 ppm.

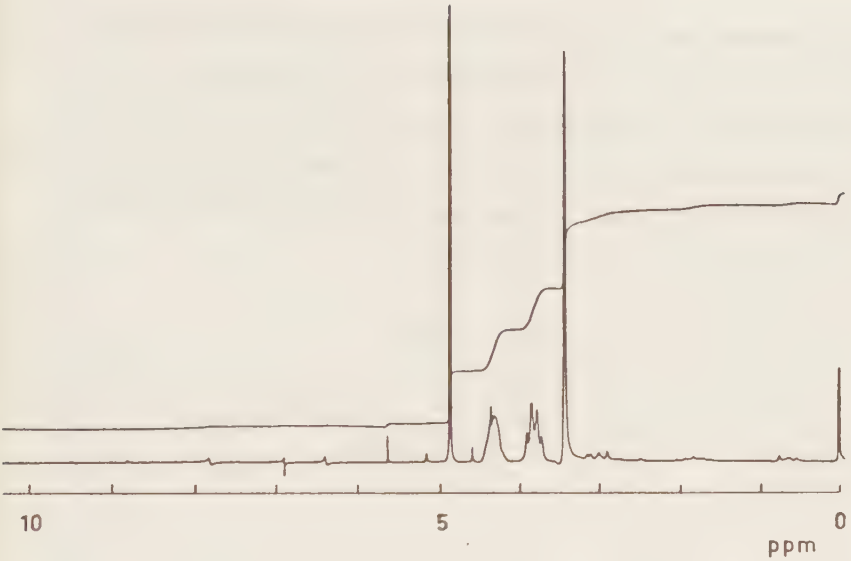


Abb. 6 NMR-Spektrum von DIP+2

2.4.3 Stabilitätsuntersuchungen

Ziel dieser Messungen war es, eine ausreichende Stabilität der beiden Substanzen DIP und DIP-Salz in wässriger Lösung zu gewährleisten, da Kosower et al. berichten, daß Lösungen dieser Stoffe nur begrenzt haltbar sind (18). Dazu wurden Elektronenspektren der beiden Stoffe aufgenommen, es ergaben sich Absorptionsmaxima für DIP bei 302 nm und für DIP+2 bei 304 nm. Es wurde sodann die Extinktion einer frisch bereiteten Lösung (37^{o}) in 5 minütigem Abstand gegen Wasser gemessen.

Die Meßreihen ergaben für beide Substanzen eine für unsere Versuchsbedingungen ausreichende Stabilität in wässrigem Milieu (Abb. 7): Die Extinktion von DIP nahm nach 60 Minuten z.B. um 1,33 % ab, nach 120 Minuten um 3,27 %; bei DIP+2 betrug die Extinktionsabnahme nach 60 Minuten 2,47 %, nach 120 Minuten 8,02 %.

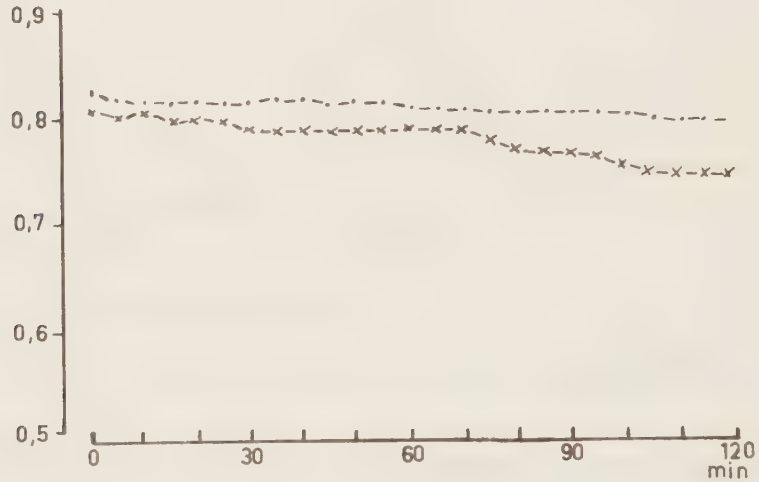


Abb. 7 Extinktion einer 0,25 mM DIP- (-.-.-.-) bzw. DIP+2- (x-x-x-x) Lösung in Abhängigkeit von der Zeit.

2.4.4 Reaktion von DIP und DIP-Salz mit reduziertem Glutathion in vitro

Die Reaktion von DIP und DIP+2 mit reduziertem Glutathion läuft, wie Kosower berichtet (38), in stöchiometrischen Mengen nach folgender Gleichung ab:

$$2\ GSH + R\text{-}N{=}N\text{-}R \longrightarrow GSSG + R\text{-}\overset{H}{\underset{H}{N}}\text{-}\overset{H}{\underset{H}{N}}\text{-}R$$

Voraussetzung für den Einsatz dieser beiden Oxidationsmittel zur Beeinflussung des insulären GSH-Gehaltes war es, zu überprüfen, ob diese Reaktion in vitro auch tatsächlich so abläuft, und ob der Reaktionsverlauf mit Hilfe der fluorimetrischen Bestimmungsmethode für GSH mit o-Phthaldialdehyd (vergl. Abschnitt 6.2.2.2) verfolgt werden kann.

Dazu wurde wie folgt vorgegangen: Eine Lösung von 200 Picomol GSH in 50 µl Metaphosphorsäure wurde mit 0, 25, 50, 75 und 100 Picomol DIP bzw. DIP+2 versetzt. Nach einer Reak-

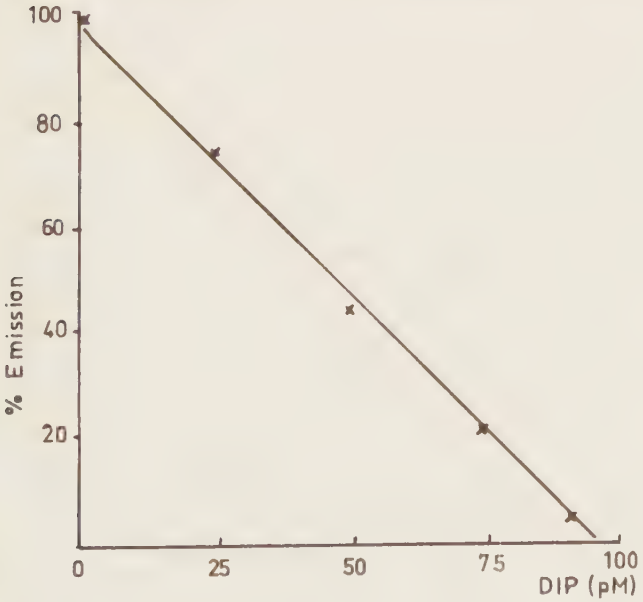


Abb. 8: Abhängigkeit der GSH-OPT-Fluoreszenz von der DIP-Konzentration. Die Meßpunkte stellen Mittelwerte aus 5 Einzelmessungen dar. Näheres siehe Text.

tionszeit von 15 Minuten in einem auf 37° thermostatierten Wasserbad (den gleichen Bedingungen wie beim Inkubieren der Inseln) wurde die Fluoreszenz der Lösungen mit Hilfe der OPT-Methode bestimmt. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen, daß die Reaktion stöchiometrisch verläuft. Beim Zusatz von 100 Picomol DIP bzw. DIP+2 wird alles GSH verbraucht, 25, 50 und 75 Picomol DIP bzw. DIP-Salz reagieren, wie erwartet,mit ca. 25, 50 bzw. 75 % des eingesetzten GSH.

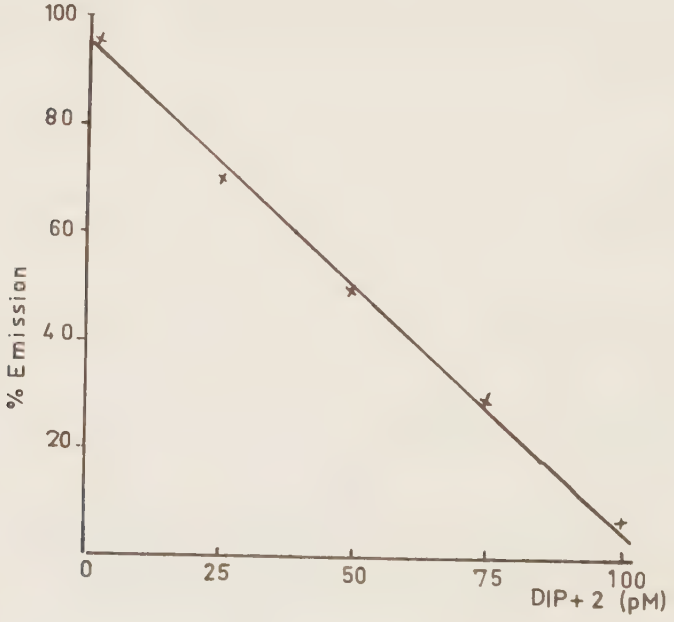


Abb. 9: Abhängigkeit der GSH-OPT-Fluoreszenz von der Konzentration von DIP-Salz. Die Meßpunkte stellen Mittelwerte aus 5 Einzelmessungen dar. Näheres siehe Text.

2.5 Elektrolytlösungen

2.5.1 Hanks'-Lösung

Stammlösung:

NaCl	80,0	g
KCl	4,0	g
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	0,60	g
KH_2PO_4	0,60	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,00	g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	1,85	g
Aqua bidest. ad	1000,0	ml

Vor Gebrauch wurde diese Stammlösung mit Aqua bidest. im Verhältnis 1:9 verdünnt und mit 0.5 mg/ml Glucose versetzt, um die Substratversorgung der Inseln zu gewährleisten. Der pH-Wert wurde genau auf 7,35 eingestellt.

2.5.2 Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRB-Lösung)

Verwendet wurde die Originalvorschrift nach Umbreit et al. (39).

NaCl-Lösung	0,9 % = 154 mM	100 Teile
KCl -Lösung	1,15 % = 154 mM	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	1,22 % = 110 mM	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	2,11 % = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lösung	3,82 % = 154 mM	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	1,30 % = 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung über längere Zeit aufbewahren zu können, wurden drei voneinander getrennte Lösungen untenstehender Zusammensetzung hergestellt. Diese wurden bei 4^{0} aufbewahrt, vor Gebrauch wurden je 10 ml der Lösungen A, B und C mit 70 ml Aqua bidest. gemischt.

Lösung A: (Stammlösung ohne $NaHCO_3$ und $CaCl_2$)

NaCl	69,2	g
KCl	3,61	g
KH_2PO_4	1,62	g
$MgSO_4.7H_2O$	2,93	g

gelöst in 1000 ml Aqua bidest.

Lösung B: ($NaHCO_3$-Lösung)

$NaHCO_3$	21,1	g

gelöst in 1000 ml Aqua bidest.

Lösung C: ($CaCl_2$-Lösung)

$CaCl_2.2H_2O$	3,73	g

gelöst in 1000 ml Aqua bidest.

Die Lösung wurde vor der Inkubation mit Carbogengas gesättigt, nach Zugabe von 2 % Rinderserumalbumin wurde der pH genau auf 7,35 eingestellt.

2.5.3 Inkubationslösungen

Im einzelnen wurden für die in vitro Versuche folgende Inkubationslösungen bereitet:

Glucose	1 mg / ml	(5,6 mM)
	2 mg / ml	(11,2 mM)
	3 mg / ml	(16,7 mM)
DIP	28,2µg / ml	(0,1 mM)
	141 µg / ml	(0,5 mM)
	282 µg / ml	(1,0 mM)
	564 µg / ml	(2,0 mM)
	jeweils mit 3 mg / ml Glucose	
DIP+2	56,6µg / ml	(0,1 mM)
	283,0 µg / ml	(0,5 mM)
	566,0 µg / ml	(1,0 mM)
	1,31 mg / ml	(2,0 mM)
	jeweils mit 1, 2 und 3 mg / ml Glucose	
Leucin	1,31 mg / ml	(10 mM)
	mit 1 mg / ml Glucose	
p-CMB	189,6µg / ml	(0,5 mM)
	mit 1 mg / ml Glucose	
	und mit 0,1; 0,5 und 1,0 mM DIP bzw. DIP+2	

2.6 Experimenteller Teil

2.6.1 Isolierte Langerhanssche Inseln nach Lacy und Kostianovsky

2.6.6.1 Operation

Die Ratten wurden mit Äther narkotisiert, das Abdomen durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und je einen Querschnitt in Becken- und Rippenhöhe eröffnet. Das Duodenum wurde mit einer Pinzette unter dem Leberlappen hervorgezogen und der dadurch sichtbare Ductus hepaticus zur Leber hin mit einem Zwirn abgebunden. Man injizierte 10 ml eisgekühlte Hanks'-Lösung in den Ductus, wodurch das Pankreas deutlich aufgebläht wurde. Mit einer Schere trennte man es von Darm, Magen, Milz und Leber ab. Es wurde in eine mit eisgekühlter Hanks'-Lösung gefüllte Petrischale überführt und sorgfältig von allen Fettpartikeln befreit.

2.6.1.2 Präparation der Langerhansschen Inseln

Das Pankreas wurde mit einer kleinen scharfen Schere gleichmäßig und fein zerschnitten, so daß sich die Teilchen mit dem Konus einer 5-ml - Recordspritze aufsaugen ließen. Das Volumen wurde mit Hanks'-Lösung auf 5 ml ergänzt, der gesamte Inhalt der Spritze wurde in ein 20-ml - Schnappdeckelglas überführt, das 25 - 30 mg Collagenase enthielt. In einem bei

37^{o} thermostatierten, schnell schüttelnden Wasserbad (Frequenz ca. 240 Bewegungen pro Minute) ließ man das Enzym so lange auf das zerkleinerte Pankreas einwirken, bis eine homogene, hellbraune Flüssigkeit entstanden war. Dies dauerte etwa 6-10 Minuten, je nach Größe der Pankreaspartikel und Aktivität der Collagenase.

Danach wurde der gesamte Inhalt des Schnappdeckelgefäßes in ein kleines Becherglas gekippt, zur weiteren Homogenisierung dreimal durch den Konus einer 5-ml - Recordspritze gesaugt und durch ein Plastiksieb in einen Meßzylinder, der mit ca. 15 ml kalter Hanks'-Lösung gefüllt war, gegossen. Auf diese Weise wurde die Collagenase-Reaktion gestoppt.

Aufgrund der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit der exokrinen Partikel und der Inseln, die infolge ihres größeren Gewichts schneller zu Boden sinken, war es möglich, beide voneinander zu trennen. Man ging so vor, daß man die Inseln absetzen ließ, den Überstand nach etwa drei Minuten absaugte und erneut in eiskalter Hanks'-Lösung aufschwemmte. Dieser Vorgang wurde ca. 10 mal wiederholt, so daß der größte Teil des exokrinen Gewebes entfernt war. Die isolierten Inseln wurden unter dem Stereomikroskop sorgfältig mit einer Mikropipette ausgelesen und auf diese Weise vollständig von allen exokrinen Partikeln getrennt.
Alle beschriebenen Schritte erfolgten unter Eiskühlung.

2.6.1.3 Vorinkubation

Zur Regeneration des Stoffwechsels nach dem Isolierungsprozess wurden die nach oben beschriebenem Verfahren gewonnenen Inseln 30 Minuten lang vorinkubiert, d.h. man sammelte die Inseln in einem 5-ml - Gläschen, welches 2-3 ml Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung (pH 7,35) nach Abschnitt 2.4.2, 2 % Albumin und zusätzlich eine substimulatorische Glucosemenge (0,6 mg/ml) enthielt. Das Gläschen wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, über eine Kanüle mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begast und im Wasserbad 30 Minuten lang bei 37^{o} geschüttelt (Frequenz: ca. 30-40 Bewegungen pro Minute). Um die Inseln von eventuell anhaftendem Insulin zu befreien, wurden sie anschließend dreimal mit eiskalter Hanks'-Lösung gewaschen.

2.6.1.4 Hauptinkubation

Jeweils 5 Inseln wurden unter Eiskühlung mit der Mikropipette in ein 2-ml - Gläschen einsortiert und mit 1 ml Hauptinkubationsmedium versetzt (KRB-Puffer nach Abschnitt 2.4.2, der 2 % Albumin und die zu untersuchenden Stoffe in der jeweils angegebenen Konzentration enthielt). Die Inseln wurden sodann 15, 60 bzw. 90 Minuten, wie bei den Versuchsbeschreibungen jeweils angegeben, inkubiert, unter Begasung mit Carbogen und langsamem Schütteln (ca. 40 Bewegungen pro Minute) bei 37^{o}.

Nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit wurden die Gläschen in ein Eisbad gestellt, um durch den Temperatursturz alle Stoffwechselvorgänge zu unterbinden. Danach ließ man bei 2^{o} in der vorgekühlten Zentrifuge fünf Minuten lang zentrifugieren und nahm vom Überstand 0,1 ml für die Insulinbestimmung ab. Zur Kontrolle wurden die Inseln in jedem Gläschen nochmal unter dem Mikroskop nachgezählt.

Die Proben wurden bis zur Durchführung des Radioimmunoassays im Gefrierschrank bei -20^{o} aufbewahrt.

Zur Weiterverarbeitung der Inseln für die Glutathionbestimmung siehe Abschnitt 2.6.2.2.

Bei jedem Versuch wurden einige Proben, die nur eine substimulatorische Glucosemenge in der Pufferlösung enthielten, mitbestimmt, um die Funktionsfähigkeit des Systems zu gewährleisten.

2.6.2 Meßmethoden

2.6.2.1 Insulinbestimmung

Die Insulinkonzentration im Medium wurde in Doppelbestimmungen durch Radioimmunoassay (Doppelantikörpermethode nach Soeldner und Slone (41)) mit dem INSIK^{R}-Kit gemessen. Die Eichkurve wurde mit Ratteninsulin erstellt.

a) Durchführung der Bestimmung

Die aufgetauten Proben und die Standardlösungen für die Eichkurve wurden mit 0,9 ml des folgenden Puffers verdünnt:

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$		550 mg
Rinderserumalbumin		100 mg
Aqua bidest.	ad	100 ml

Von den auf diese Weise erhaltenen Proben (Volumen 1 ml) wurden wiederum 0,1 ml für die Bestimmung in zuvor durchnummerierte Polystyrol-Teströhrchen einpipettiert. Mit der Verdünnungsreihe für die Eichkurve (Bereich 0-15 µE Insulin /0,1 ml) verfuhr man ebenso. Als Leerwert legte man 0,1 ml des obigen Puffers vor (Nullpunkt der Eichkurve).

Der lyophilisierte Antikörper wurde lt. Vorschrift gelöst, jeweils 100 µl davon wurden zu den Proben gegeben, die sorgfältig durchmischt und danach 6 Stunden im Kühlschrank auf-

bewahrt wurden. Nach Zugabe des gelösten J-125-markierten Insulins (100 µl) inkubierte man die Proben 18 Stunden im Kühlschrank.

Anschließend pipettierte man zu allen Proben 1 ml kalten Puffer (Zusammensetzung siehe oben) und zentrifugierte 20 Minuten lang mit 3500 U / min bei 4^{o}, so daß der Überstand vom Doppelantikörperkomplex dekantiert werden konnte. Eventuell am Gläschen haftende Tröpfchen wurden mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die Proben wurden in einem automatischen Gamma-Zähler gemessen. Die Zähldauer wurde so eingestellt, daß die Proben für den Nullpunkt der Eichkurve (sie enthielten ausschließlich markiertes Insulin) mehr als ca. 6000 Counts aufwiesen. Mit dieser Zeit, meistens 60 Sekunden, wurden dann alle Proben des Bestimmungsansatzes gemessen.

b) Berechnung der Insulinwerte

Aus den Doppelbestimmungen ließ sich der Mittelwert der Zählrate bestimmen. Man bildete den Quotienten aus der jeweiligen Zählrate der Proben und der Zählrate des Leerwerts ($\frac{c_o}{c_x}$) und konnte dann, anhand der ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve, die Insulinwerte der Proben in einem Computerprogramm errechnen.

c) Einfluß von DIP und DIP-Salz auf den RIA

In der vorliegenden Arbeit wurden als pharmakologische Hilfsstoffe zur Beeinflussung des Stoffwechsels der Langerhansschen Inseln DIP und DIP-Salz verwendet. Dazu mußte sicher gestellt werden, daß diese Hilfsstoffe die radioimmunologische Bestimmung von Insulin nicht stören, um auszuschließen, daß eine mögliche zu beobachtende Hemmung der Insulinsekretion nicht auf einer Beeinflussung des Radioimmunoassays beruht.

Abb. 10 zeigt 3 Eichgeraden; Gerade 1 ohne Zusätze, die Proben der Geraden 2 und 3 wurden jeweils mit 2,0 mM DIP bzw. DIP-Salz versetzt, der stärksten Konzentration, die in den Versuchsreihen verwendet wurde. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, wird der Radioimmunoassay durch DIP und DIP-Salz nicht gestört.

2.6.2.2 Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion

a) Prinzip

Die Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion erfolgte fluorimetrisch nach einer Methode, die 1966 erstmals von Cohn und Lyle für GSH beschrieben wurde (42). 1976 erweiterten Hissin und Hilf die Methode und ermöglichten eine Bestimmung sowohl von oxidiertem als auch von reduziertem Glutathion (43). Ammon und Grimm zeigten 1978, daß mit diesem Verfahren auch eine Bestimmung von GSH und GSSG in Inselgewebe möglich ist (14).

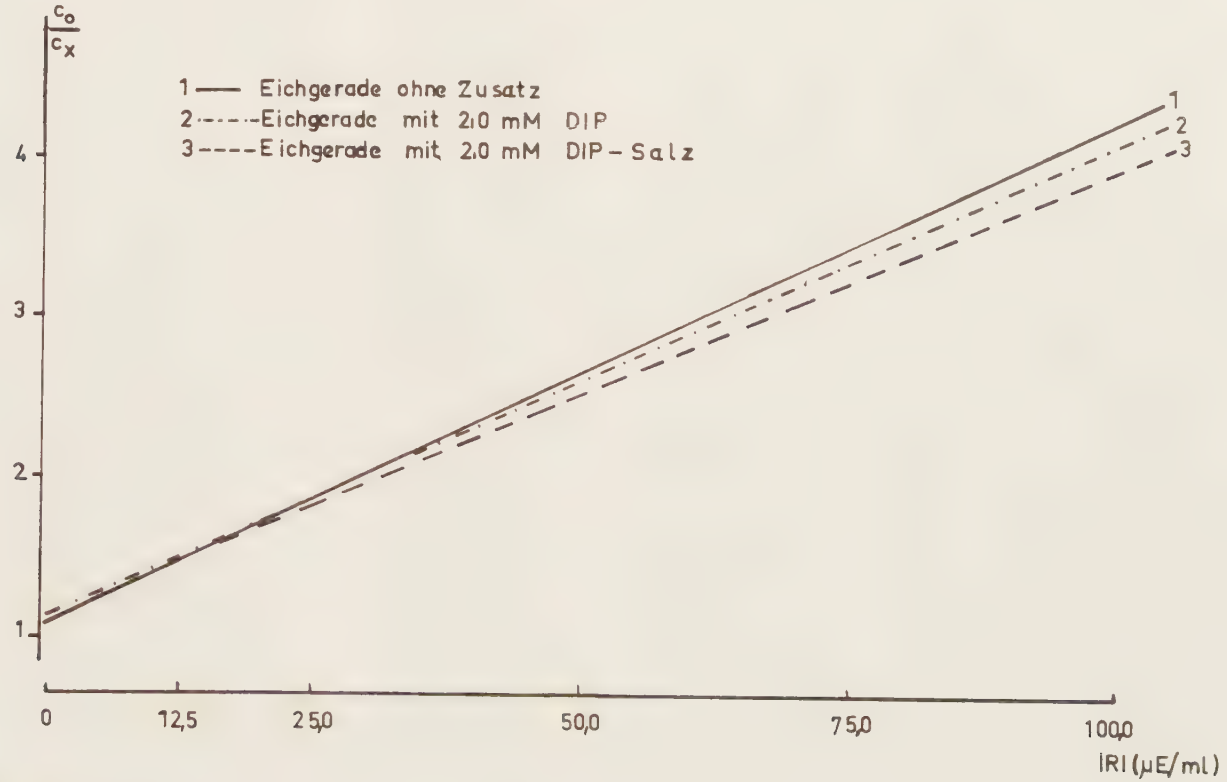
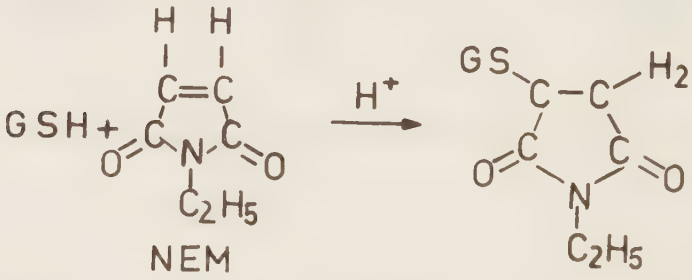

$\frac{c_o}{c_x}$
1 —— Eichgerade ohne Zusatz
2 -·-·- Eichgerade mit 2,0 mM DIP
3 ---- Eichgerade mit 2,0 mM DIP-Salz
4
3
2
1
0
12,5
25,0
50,0
75,0
100,0
IRI (µE/ml)
1
2
3

Abb. 10

Das Verfahren beruht darauf, daß sowohl GSH als auch GSSG mit ortho-Phthaldialdehyd (OPT) einen stark fluoreszierenden Komplex bilden, der quantitativ ausgewertet werden kann. Die Messung erfolgt bei 420 nm (Emission) nach Anregung bei 350 nm. Bei einem pH-Wert von 12 ist die Reaktion spezifisch für oxidiertes Glutathion, bei pH 8 ist sie spezifisch für reduziertes Glutathion. Unter pH 8 nimmt die Fluoreszenz schnell ab.

Bei der Bestimmung von GSSG ist es möglich, das reduzierte Glutathion mit N-Äthylmaleinimid (NEM) durch Umsetzung nach unten stehender Gleichung zu blockieren;die im Alkalischen bevorzugte Oxidation zu GSSG kann dadurch verhindert werden.



Die quantitative Entfernung von überschüssigem NEM durch Ausäthern (wie bei der enzymatischen GSH/GSSG-Bestimmung mittels Glutathionreductase nach Tietze (44)) ist bei dieser Methode nicht notwendig.

Beutler und West haben kürzlich berichtet, daß man mit der Bestimmung von GSSG nach Hissin und Hilf (43) in Leberge-

webe nicht ausschließlich GSSG erfaßt und eher zu hohe Werte erhält (45). Wir können dies für Pankreasinseln zwar nicht ausschließen, gegen eine solche Annahme sprechen jedoch Befunde, bei denen GSSG in Ratteninseln nach der Methode von Tietze (enzymatisches Cycling, 44) bestimmt wurde. Mit dieser Methode wurden Werte gefunden, die mit denen in dieser Arbeit übereinstimmen (14).

b) Durchführung der Bestimmung

Die nach Abschnitt 2.6.1.2 und 2.6.1.3 vorinkubierten und inkubierten Inseln wurden unter dem Mikroskop soweit als möglich abgesaugt, in flüssigem Stickstoff vorgefroren und anschließend in einer vorgekühlten Christ-Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Zur weiteren Eiweißdenaturierung versetzte man dann mit 100 µl kalter 3%-iger Meta-Phosphorsäurelösung (MPA). Die Inselzellen wurden sodann 20 Minuten lang im Ultraschalldesintegrator bei einer Frequenz von 40000 Hz homogenisiert. Danach wurde eine Stunde lang bei 20000 U/min und 0^{o} zentrifugiert. In der gelösten Fraktion befand sich nun das freie GSH und GSSG.

Vom Zentrifugenüberstand wurden aus jeder Probe 80 µl entnommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Bestimmung von GSH

Man gab zu jeder Probe (80 µl) soviel Trinatriumphosphatlösung, daß sich ein pH-Wert von 8 einstellte. (Das dazu nötige Volumen, ca. 44 µl einer 15%-igen Na_3PO_4-Lösung, wurde von Zeit zu Zeit durch Titration überprüft, da die MPA leicht hydrolysiert.) Nach Zugabe von 0,5 ml Phosphatpuffer pH 8 (0,1 M Na-Phosphat/0,005 M EDTA) pipettierte man im 30-Sekunden-Abstand zu jeder Probe 50 µl OPT-Reagenz. 10 mg OPT wurden dazu in 10 ml Methanol für die UV-Spektroskopie gelöst. Sämtliche Proben wurden im Whirl-Mix gut durchmischt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Minuten erfolgte die fluorimetrische Messung, ebenfalls im 30 Sekunden-Abstand.

Für die Eichkurve wurde folgende Verdünnungsreihe in der gleichen Weise wie die Proben behandelt: 20; 15; 10; 7,5; 5; 2,5 und 0 ng GSH, jeweils in 80 µl MPA gelöst.

Bestimmung von GSSG

Jede Probe wurde wieder mit 44 µl Na_3PO_4-Lösung auf pH 8 gebracht, anschließend gab man sofort 40 µl NEM-Lösung (2mM) zu. Die Proben wurden mit dem Whirl-Mix gut durchmischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 0,5 ml 0,1 n NaOH stellte man auf pH 12 ein. Danach pipettierte man wieder - wie schon vorher beschrieben - alle 30 Sekunden OPT-Reagenzlösung zu und bestimmte die Proben nach

15 Minuten im Fluorimeter. Die Verdünnungsreihe für die Eichkurve wurde in gleicher Weise wie bei der GSH-Bestimmung beschrieben erstellt.

c) Berechnung der Ergebnisse

Die Werte für die unbekannten Proben wurden nach Aufstellen der Eichkurve mit Hilfe eines Computerprogrammes mit einem Olivetti-Tischcomputer errechnet.
Zur Berechnung der molaren Konzentrationen von GSH und GSSG wurden folgende Molekulargewichte zugrunde gelegt:
GSH : Molekulargewicht = 307,3
GSSG: Molekulargewicht = 612,6

2.6.3 Versuchsauswertung

Alle angegebenen Werte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar, errechnet aus der in den Abbildungen und Tabellen angegebenen Zahl von Versuchen (n).

Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t - Test nach Student verwendet.

3. E R G E B N I S S E

3.1 Einfluß von DIP und DIP+2 auf reduziertes und oxidiertes Glutathion, GSH/GSSG-Quotienten und Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte.

3.1.1 Einfluß von DIP und DIP+2 auf den GSH- und GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten (Redox-Status) Langerhansscher Inseln der Ratte.

Grimm hatte 1978 festgestellt, daß der GSH/GSSG-Quotient Langerhansscher Ratteninseln mit steigender Glucosekonzentration zunimmt, wenn man die Inseln 15 Minuten inkubiert. Bei 90-minütiger Inkubationszeit war diese Abhängigkeit nicht festzustellen (14). Unter Berücksichtigung dieser Befunde wurde die Inkubationszeit in dieser Versuchsreihe auf 15 Minuten festgesetzt, Veränderungen im insulären GSH- und GSSG-Gehalt sind nach dieser Zeit gut meßbar, eine Verfälschung des Ergebnisses durch einen möglichen negativen Feedback-Mechanismus infolge Anhäufung sezernierten Insulins im Medium ist bei dieser relativ kurzen Inkubationszeit jedoch noch nicht zu befürchten.

In der Abbildung 11 und Tabelle 1 ist der Einfluß verschiedener DIP-Konzentrationen auf den GSH-Gehalt isolierter Rattenpankreasinseln dargestellt.

DIP in einer Konzentration von 0,1 mM senkt in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose den insulären GSH-Gehalt bereits signifikant von 76 auf 40 Picomol. Die Konzentrationen von 0,5 und 1,0 mM DIP führten zu einer weiteren dosisabhängigen Senkung des GSH-Gehalts.

Bei der Konzentration von 2,0 mM DIP war gegenüber der Konzentration von 1,0 mM wieder ein leichter Anstieg zu verzeichnen, der jedoch nicht statistisch zu sichern ist. Es muß hier jedoch angemerkt werden, daß bei dieser Konzentration bereits toxische Einflüsse zu sehen waren, bei Betrachtung unter dem Mikroskop waren die Inseln teilweise beschädigt.

Auf den Einsatz von DIP und DIP+2 in höheren Konzentrationen als 1,0 mM wurde daher bei manchen weiteren Versuchsreihen verzichtet.

Mit der Abnahme des insulären GSH-Gehalts unter dem Einfluß von DIP verbunden war ein leichter Anstieg des GSSG-Gehalts (Abb.12 und Tab. 2). Die Zunahme des GSSG erscheint im Vergleich zur GSH-Abnahme gering, hier ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Darstellung in der Abbildung als pmol GSSG erfolgt und eine Abnahme von 2 pmol GSH nur zur Zunahme von 1 pmol GSSG führt. Auf weitere mögliche Gründe für den relativ geringen Anstieg des GSSG wird im Diskussionsteil (s.S.101) noch näher eingegangen.

Abb. 13 und Tabelle 3 zeigen, daß auch der insuläre GSH/GSSG-Quotient (Redox-Status) unter dem Einfluß von DIP dosisabhängig gesenkt wird.

In Untersuchungen mit der ionisierten, nicht membrangängigen Verbindung DIP+2 ließen sich in den gleichen molaren Konzentrationen keine statistisch signifikanten Einflüsse auf den GSH-Gehalt der isolierten Ratteninsel feststellen (Abb.14 und Tab.4).

Auch der insuläre GSSG-Gehalt und der GSH/GSSG-Quotient waren unter dem Einfluß von DIP+2 in den genannten Konzentrationen nicht signifikant verändert (Abb. 15 und 16, sowie Tab. 5 und 6).

Tabelle 1:

Einfluß von DIP auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose bei 15-minütiger Inkubation.

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 3 mg/ml				
	DIP 0 mM	DIP 0,1 mM	DIP 0,5 mM	DIP 1,0 mM	DIP 2,0mM
46,53±5,03 (22)	76,04±11,8 (26)	40,46±5,13 (22)	38,66±5,22 (22)	24,69±3,84 (20)	34,54±3,8 (22)
A	B	C	D	E	F

Angaben in pmol/10 Inseln/15 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung:

A:B	$P < 0,02$	B:C	$P < 0,02$	C:D	n.s.
A:C	n.s.	B:D	$P < 0,01$	C:E	$P < 0,02$
A:D	n.s.	B:E	$P < 0,001$	C:F	n.s.
A:E	$p < 0,005$	B:F	$P < 0,005$	D:E	$P < 0,05$
A:F	n.s.			D:F	n.s.
				E:F	n.s.

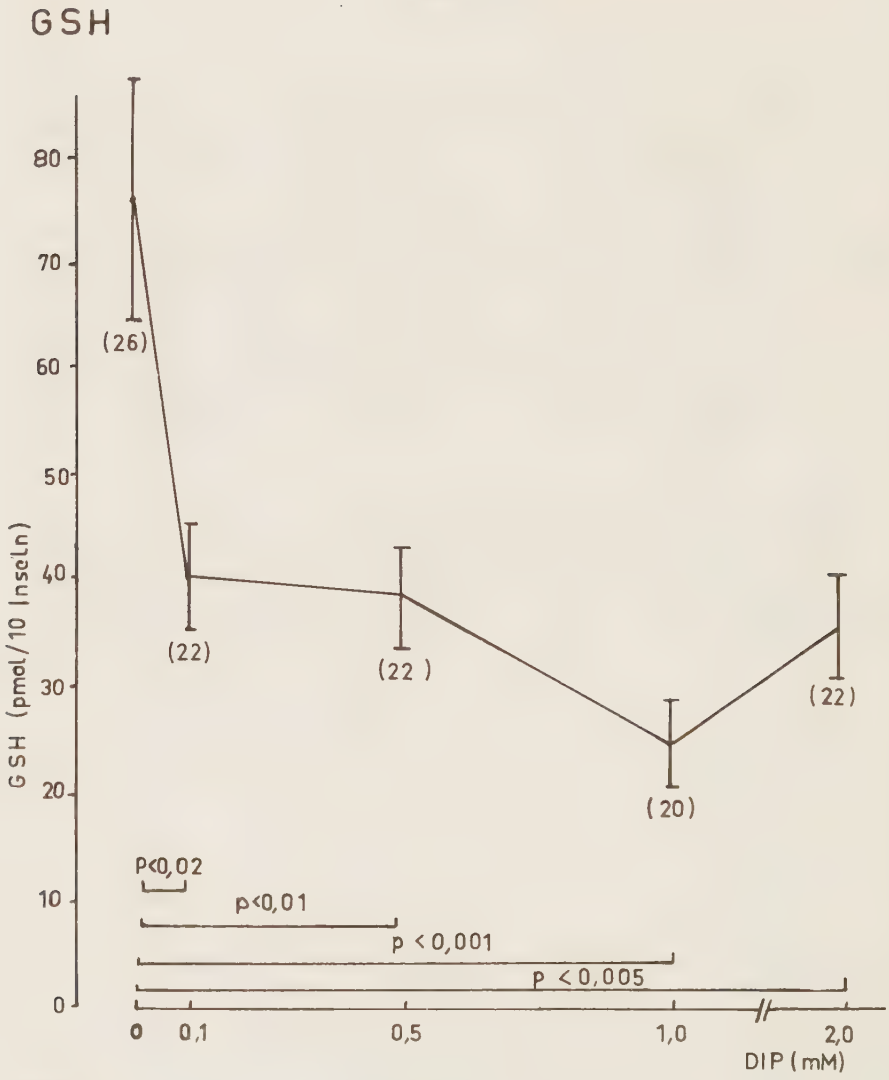


Abb. 11:

Einfluß von DIP auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 min inkubiert.
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern

Tabelle 2:

Einfluß von DIP auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose bei 15-minütiger Inkubation.

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 3 mg/ml				
	DIP 0 mM	DIP 0,1mM	DIP 0,5mM	DIP 1,0mM	DIP 2,0mM
44,35 ± 7,66 (25)	34,73±5,53 (24)	39,32±5,45 (23)	44,36±7,53 (22)	43,12±6,02 (21)	69,71±10,26 (21)
A	B	C	D	E	F

Angaben in pmol GSSG / 10 Inseln / 15 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung:

A:F $P < 0,05$
B:F $P < 0,005$
C:F $P < 0,02$
D:F n.s.
E:F $P < 0,05$

Alle anderen Mittelwerte sind nicht signifikant voneinander verschieden.

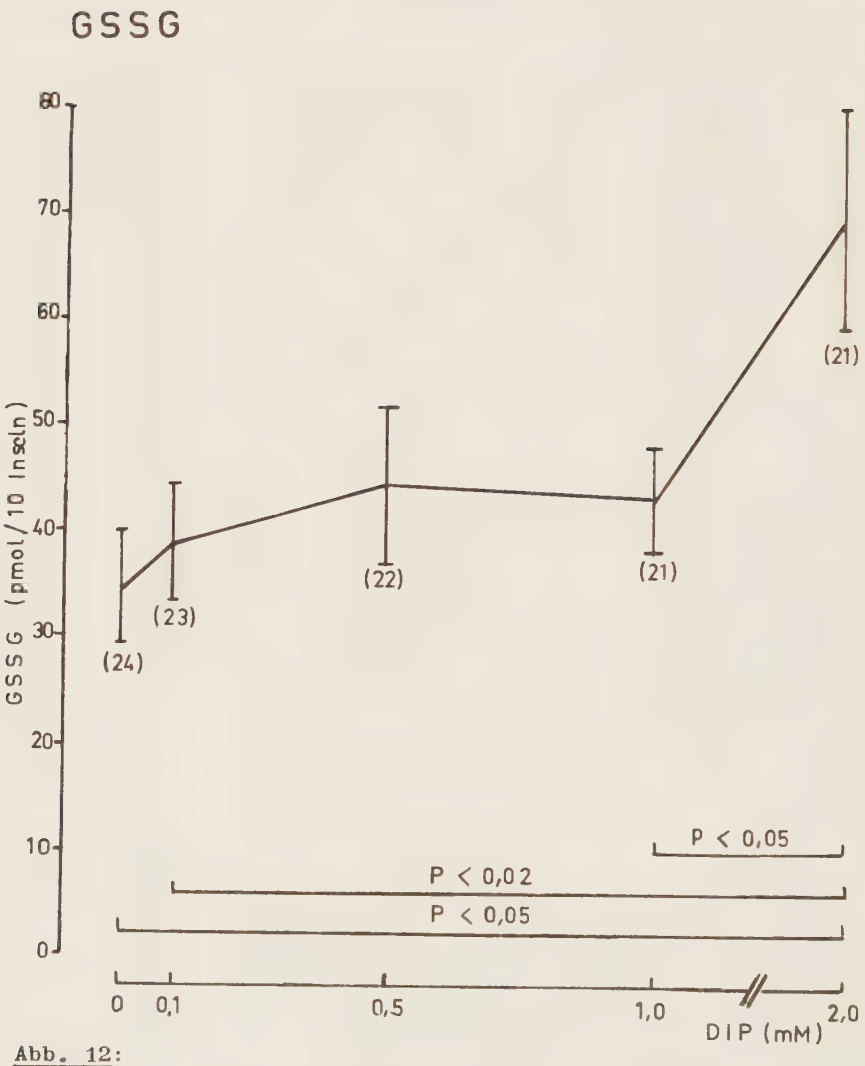


Abb. 12:

Einfluß von DIP auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern.

Tabelle 3:

Einfluß von DIP auf den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg / ml Glucose.

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 3 mg/ml				
	DIP 0mM	DIP 0,1mM	DIP 0,5mM	DIP 1,0mM	DIP 2,0 mM
0,52	1,09	0,51	0,43	0,28	0,24

Die Werte wurden errechnet aus den in Tabelle 1 und 2 angegebenen GSH-und GSSG-Werten. GSSG wurde als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG $\hat{=}$ 2 pmol GSH).

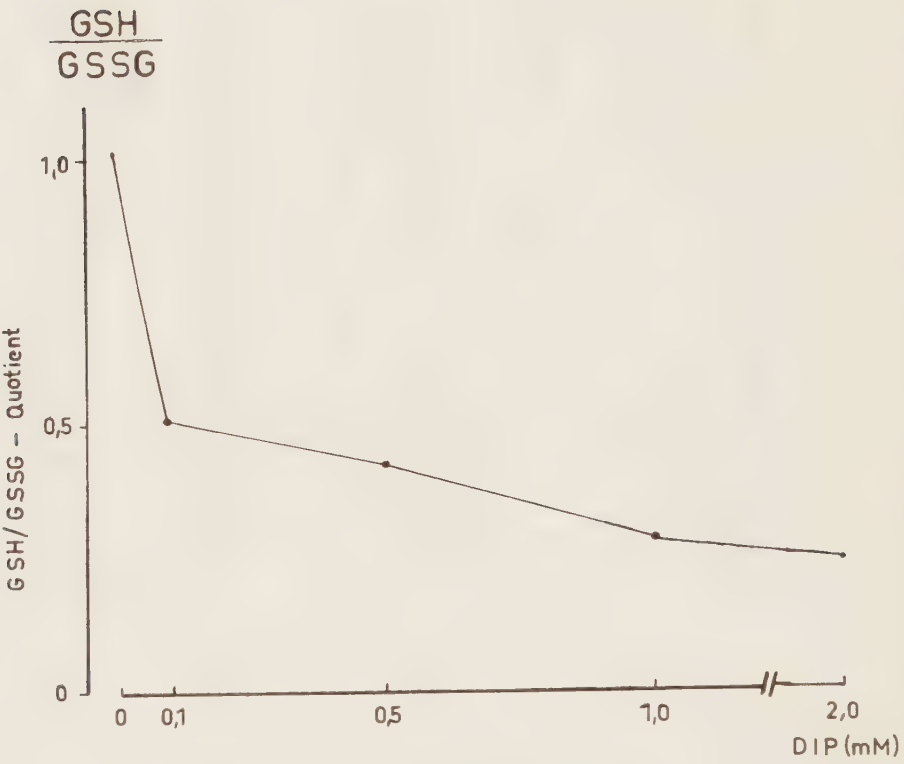


Abb. 13

Einfluß verschiedener Konzentrationen von DIP auf den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose nach 15 - minütiger Inkubation.
Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tabellen 1 und 2 entnommen; die GSSG-Werte wurden als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

Tabelle 4:

Einfluß von DIP+2 auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose.

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 3 mg/ml				
	DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1mM	DIP+2 0,5mM	DIP+2 1,0mM	DIP+2 2,0mM
40,84 ± 4,55 (24)	66,03±6,24 (22)	63,30±7,25 (29)	56,88±6,99 (29)	66,05±6,79 (28)	85,25±14,42 (24)
A	B	C	D	E	F

Angaben in pmol / 10 Inseln / 15 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung: A:B $P < 0,005$ A:E $P < 0,005$
A:C $P < 0,02$ A:F $P < 0,01$
A:D $P < 0,05$
Alle anderen Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

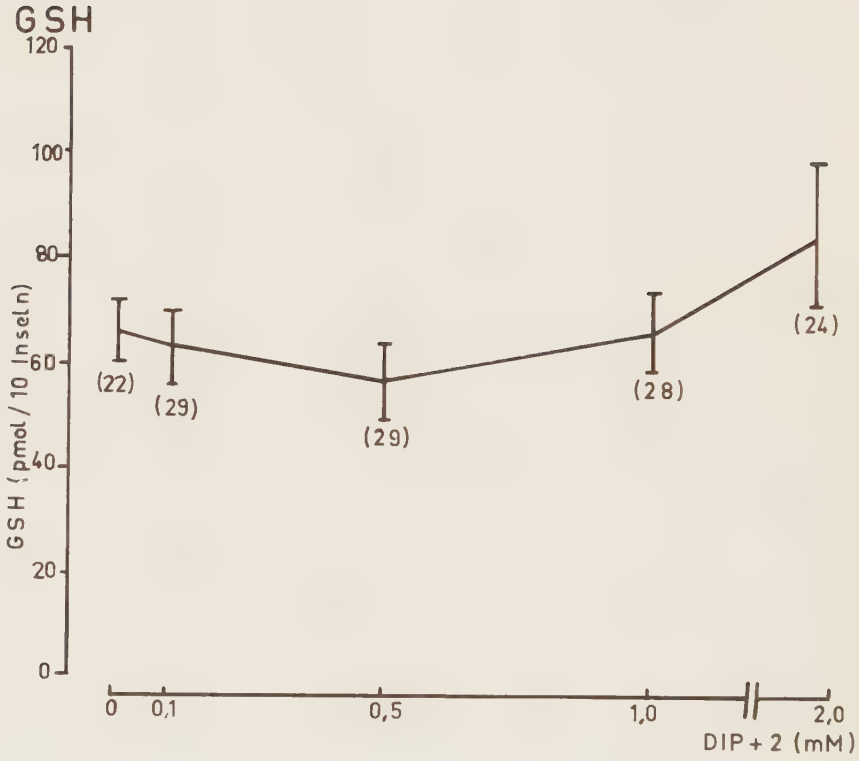


Abb. 14:

Einfluß von DIP+2 auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern.

Tabelle 5:

Einfluß von DIP+2 auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose.

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 3 mg/ml				
	DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1mM	DIP+2 0,5mM	DIP+2 1,0mM	DIP+2 2,0mM
26,32 ± 3,11 (24)	24,07±2,21 (24)	25,78±2,54 (25)	25,11±2,07 (28)	27,28±2,83 (28)	44,21±6,05 (24)
A	B	C	D	E	F

Angaben in pmol GSSG / 10 Inseln / 15 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung: A:F $P < 0,02$ D:F $P < 0,05$
B:F $P < 0,005$ E:F $P < 0,02$
C:F $P < 0,01$
Alle anderen Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

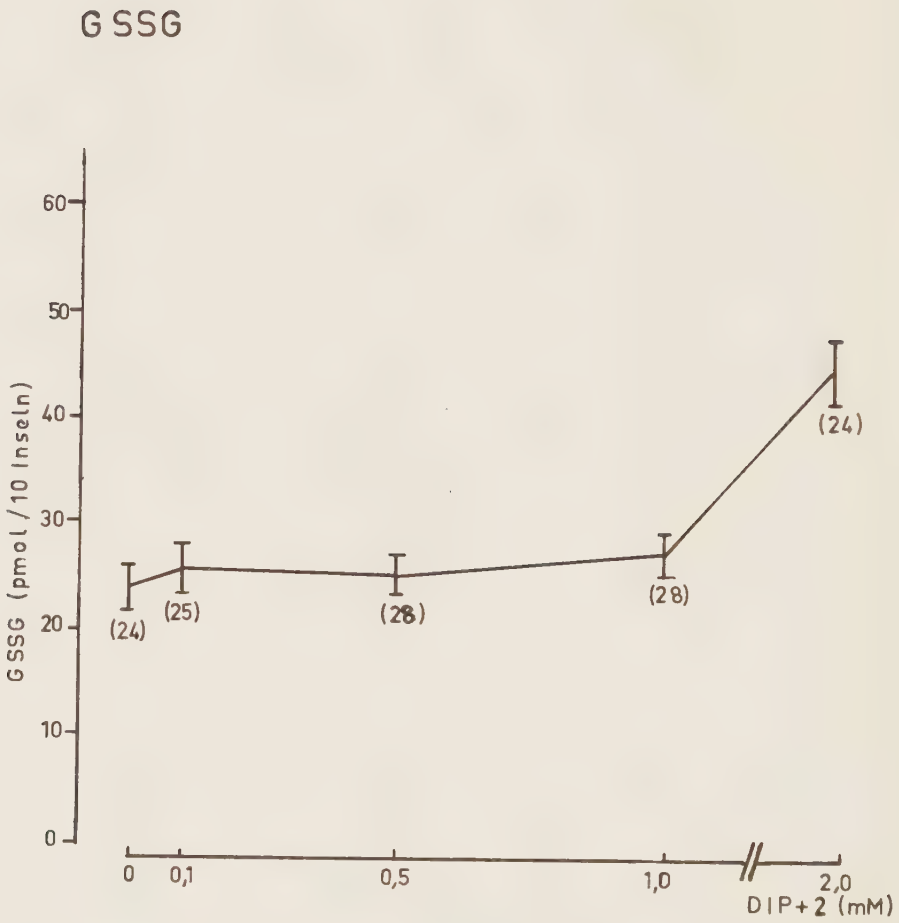


Abb. 15:

Einfluß von DIP+2 auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern.

Tabelle 6:

Einfluß von DIP+2 auf den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg / ml Glucose:

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 3 mg / ml				
	DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1mM	DIP+2 0,5mM	DIP+2 1,0mM	DIP+2 2,0mM
0,77	1,37	1,22	1,12	1,12	0,96

Die Werte wurden errechnet aus den in den Tabellen 4 und 5 angegebenen GSH- und GSSG-Werten. GSSG wurde als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

Abb. 16:

Einfluß von DIP+2 auf den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden den Tabellen 4 und 5 entnommen.
GSSG wurde als pmol GSH berechnet (1pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

3.1.2 Einfluß von DIP und DIP+2 auf die Glucose induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte

Die Abbildungen 17 und 18 und die Tabellen7 und 8 zeigen, daß nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten mit einer Glucosekonzentration von 3 mg/ml (entsprechend 16,7 mM) noch keine deutlich erhöhten Insulinmengen im Medium gemessen werden können, der Unterschied zwischen den mit 3 mg/ml stimulierten Inseln gegenüber den nicht stimulierten Kontrollinseln betrug nur 48 bzw. 82 µE.

Demzufolge waren bei dieser Inkubationszeit auch weder bei DIP noch bei DIP+2 - wie den Abb. 17 und 18 bzw. den Tab. 7 und 8 zu entnehmen ist - irgendwelche Einflüsse auf den Insulinspiegel meßbar.

Im nächsten Schritt wurde die Inkubationszeit daher so gewählt, daß einerseits von den Inseln eine deutlich meßbare Menge von Insulin ins Medium abgegeben wird, andererseits jedoch gewährleistet bleibt, daß sich die beiden pharmakologischen Hilfsstoffe DIP und DIP+2 während der Dauer der Inkubation nicht zersetzen (vergl. Abschnitt 2.4.3).

Die Glucosekonzentration im Medium betrug wieder 3 mg / ml, die Inkubationszeit wurde auf 60 Minuten erhöht. 3 mg/ml Glucose führten, wie Abb. 19 und Tab. 9 zeigen, nach 60 Minuten zu einer Steigerung der Insulinsekretion um 224 µE auf 288 µE/ml gegenüber dem Basalwert (64 µE). Bei einer Konzentra-

tion von 0,5 und 1,0 mM DIP wird die Glucose induzierte Insulinsekretion signifikant gehemmt, 1 mM DIP senkt die Sekretion von Insulin von 288 auf 145 µE. Die Konzentration von 0,1 mM DIP führte bezüglich der Insulinsekretion noch zu keinen Hemmeffekten; bei höheren Konzentrationen von 2 mM und mehr waren toxische Effekte zu verzeichnen, bei Betrachtung unter dem Mikroskop waren die Inseln teilweise beschädigt, die Insulinwerte im Medium lagen unverhältnismäßig hoch, über 1000 µE / ml, wahrscheinlich aufgrund des Auslaufens lädierter Zellen.

Abb. 20 und Tab. 10 zeigen den Einfluß verschiedener Konzentrationen von DIP+2 auf die Glucose (3mg/ml) induzierte Insulinsekretion. Bei äquimolaren Mengen DIP+2 zeigte sich bei 0,1 und 0,5 mM keine Hemmung der Insulinsekretion, bei einer Konzentration von 1,0 mM war ein schwacher Hemmeffekt zu verzeichnen, der allerdings nicht so ausgeprägt war wie bei äquimolaren Mengen DIP, die Insulinsekretion wurde von 439 auf 286 µE gesenkt.

In weiteren Versuchen wurde der Frage nachgegangen, ob DIP+2 möglicherweise eine stimulierende bzw. den Glucoseeffekt verstärkende Wirkung auf die Insulinsekretion ausübt. Dazu wurden 2 weitere Glucosekonzentrationen, eine nicht stimulierende und eine nicht maximal stimulierende, (1 mg/ml, entsprechend 5,6 mM und 2 mg/ml, entsprechend 11,2 mM) mit den drei verschiedenen Konzentrationen von

DIP+2 inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 21 und 22 und in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

Bei einer Glucosekonzentration von 2 mg/ml zeigte keine der verwendeten DIP-Salz Konzentrationen einen Effekt. (Abb. 21 und Tab. 11). In Gegenwart von 1 mg/ml Glucose führten 0,5 mM DIP-Salz zu einem signifikanten Anstieg der Insulinsekretion von 74 auf 123,4 µE, bei höherer Konzentration von DIP-Salz (1,0 mM) sank die Insulinsekretion wieder auf 100 µE ab. (Abb.22 und Tab.12).

Inkubiert man Langerhanssche Inseln mit verschiedenen Konzentrationen von DIP in Gegenwart von 1 mg / ml Glucose, so war dagegen keine signifikante Veränderung des Basalwertes festzustellen (Abb.23 und Tabelle 13).

Tabelle 7:

Einfluß von DIP auf die Glucose (16,7 mM) induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation.

Kontrolle Glucose 5,6mM	Glucose 16,7 mM				
	DIP 0 mM	DIP 0,1 mM	DIP 0,5 mM	DIP 1,0 mM	DIP 2,0 mM
137,4 ± 9,82 (10)	185,5±18,5 (19)	223 ± 33,52 (16)	183,8±27,04 (19)	199,8±28,80 (15)	270 ± 62,9 (15)
A	B	C	D	E	F

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / 15 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: A:C $P < 0,05$
Alle anderen Mittelwerte sind nicht signifikant voneinander verschieden.

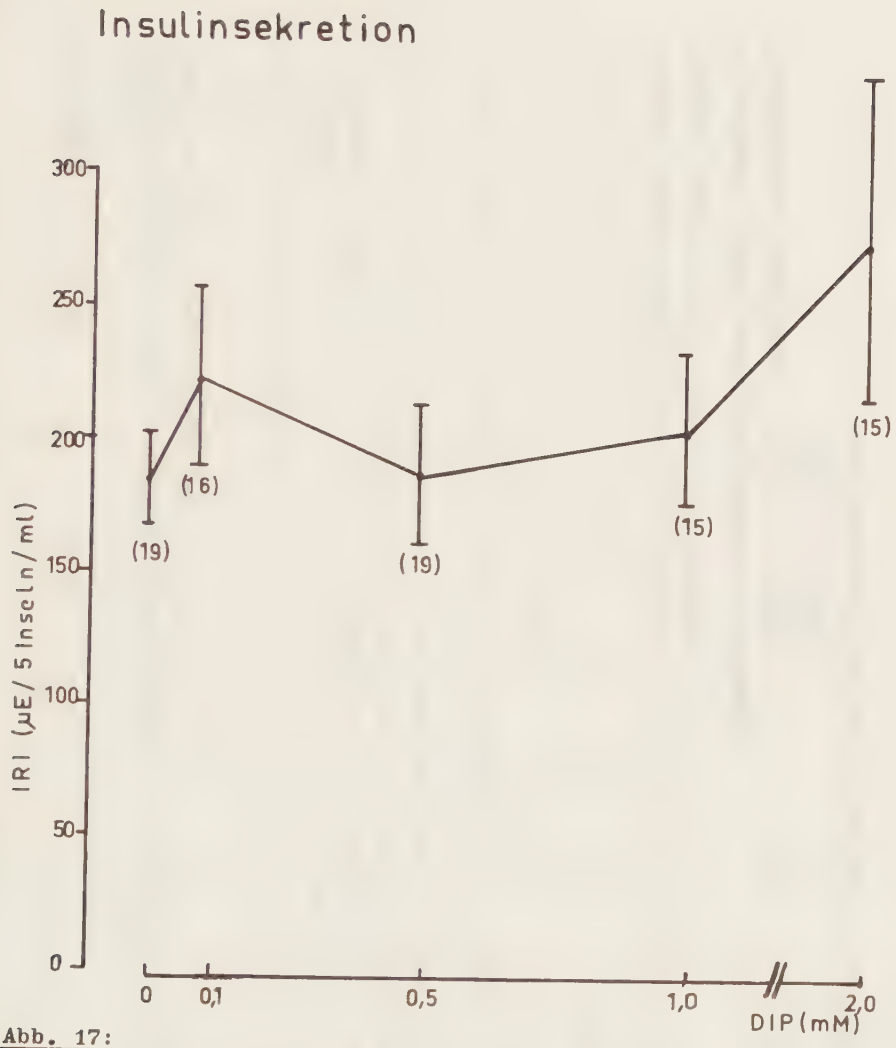


Abb. 17:

Einfluß von DIP auf die Glucose (3mg/ml) induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert.

Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche in Klammern.

Tabelle 8:

Einfluß von DIP+2 auf die Glucose (16,7 mM) induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation.

Kontrolle Glucose 5,6 mM	Glucose 16,7 mM				
	DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1mM	DIP+2 0,5mM	DIP+2 1,0mM	DIP+2 2,0mM
94,26 ± 8,21 (15)	190.3±23,99 (19)	217,8±30,9 (19)	200,0±25,52 (19)	214,0±29,27 (19)	193,11±24,97 (18)
A	B	C	D	E	F

Angaben in µE / IRI / 5 Inseln / 15 Minuten

Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: A:B $P < 0,005$ A:E $P < 0,005$
A:C $P < 0,005$ A:F $P < 0,005$
A:D $P < 0,005$

Alle anderen Mittelwerte sind nicht signifikant voneinander verschieden.

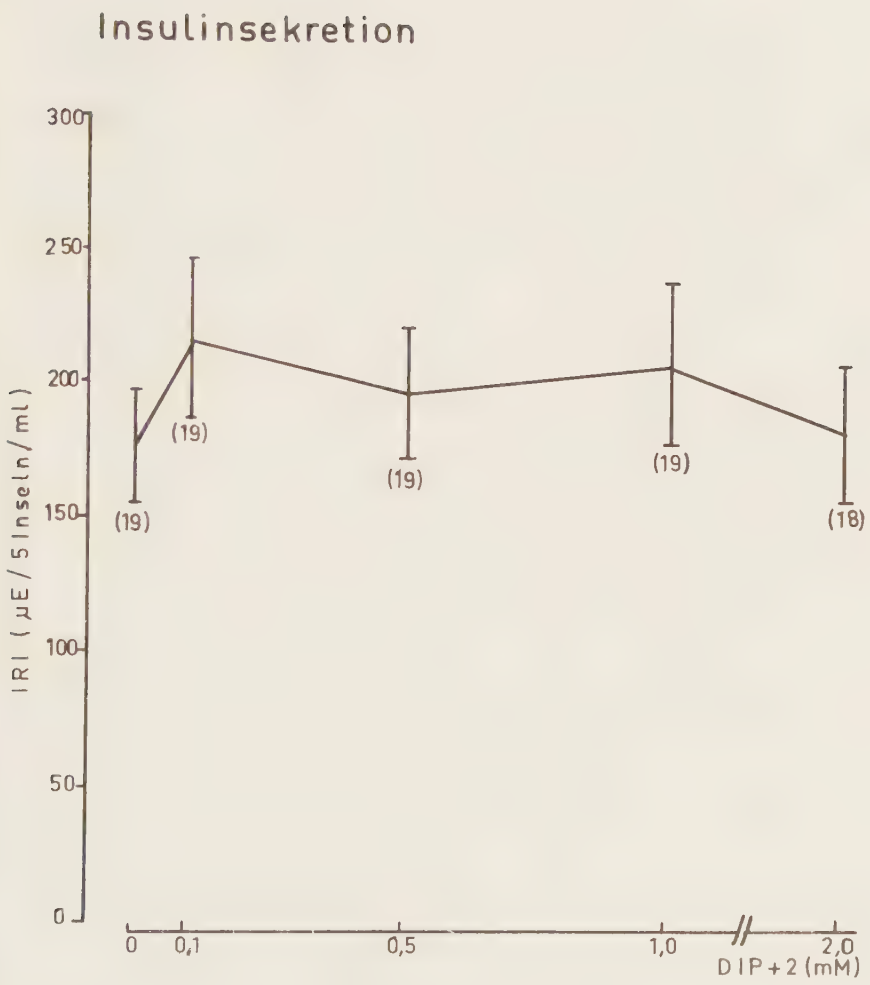


Abb. 18:

Einfluß von DIP+2 auf die Glucose (3mg/ml) induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM,

Anzahl der Versuche in Klammern.

Tabelle 9:

Einfluß von DIP auf die Glucose (16,7 mM) induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte nach 60-minütiger Inkubation.

Kontrolle Glucose 5,6mM	Glucose 16,7 mM				
	DIP 0 mM	DIP 0,1 mM	DIP 0,5 mM	DIP 1,0 mM	DIP 2,0 mM
64,0 ± 7,42 (10)	288,6±35,2 (13)	284,0±34,27 (10)	174,8±28,55 (10)	145,4±17,3 (10)	994,7±116 (9)
A	B	C	D	E	F

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / 60 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung:

A:B	$P < 0,001$	C:D	$P < 0,05$
A:C	$P < 0,001$	C:E	$P < 0,01$
B:D	$P < 0,05$	E:F	$P < 0,001$
B:E	$P < 0,01$		

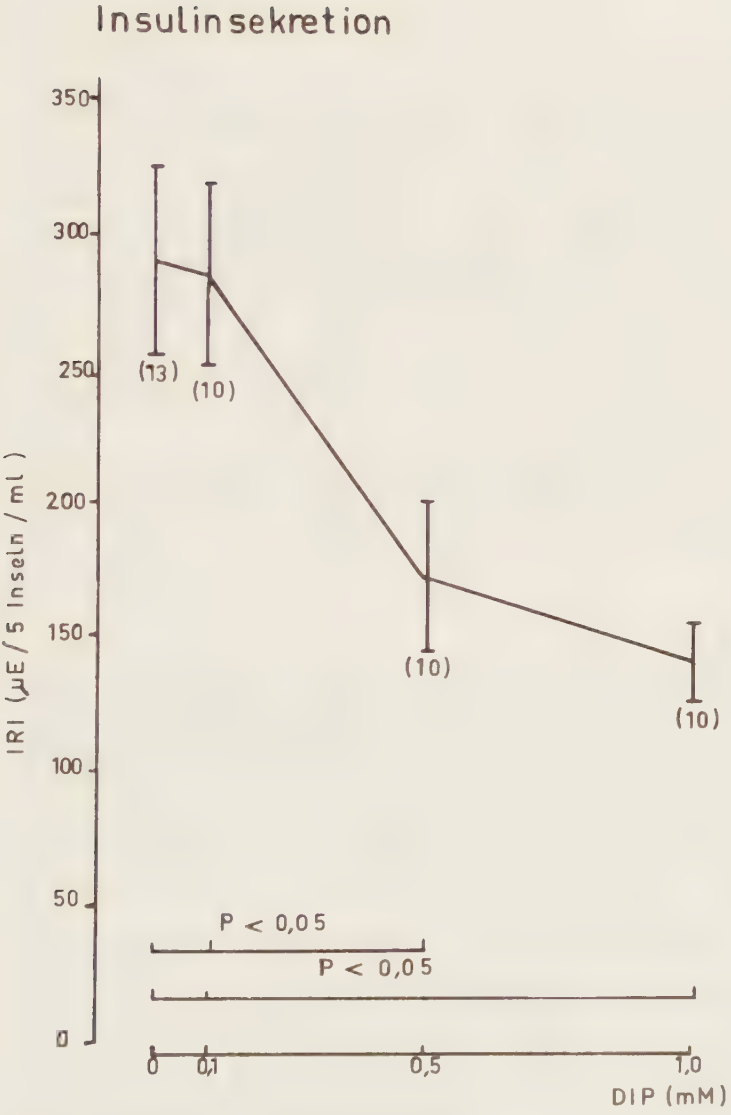


Abb. 19:

Einfluß von DIP auf die Glucose (3 mg/ ml) induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 60 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern

Tabelle 10:

Einfluß von DIP+2 auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose

DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1 mM	DIP+2 0,5 mM	DIP+2 1,0 mM
433 ±29,1 (13)	439,3 ± 46,2 (13)	402,5 ± 35,5 (13)	286,1 ± 26,2 (11)
A	B	C	D

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / 60 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung: B:D $P < 0,01$
C:D $P < 0,01$

Tabelle 11:

Einfluß von DIP+2 auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 2 mg/ml Glucose:

DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1mM	DIP+2 0,5mM	DIP+2 1,0mM
251,4 ±48,7 (7)	235 ± 29,3 (9)	246 ± 40,1 (8)	236 ± 30,9 (7)

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / 60 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung: Die Mittelwerte sind nicht signifikant voneinander verschieden.

Tabelle 12:

Einfluß von DIP+2 auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg / ml Glucose

DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1mM	DIP+2 0,5mM	DIP+2 1,0mM
74,1±10,62 (9)	82,6±12,40 (9)	123,3±10,1 (10)	100,1±18,9 (9)
A	B	C	D

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / 60 Minuten
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: A:C $P < 0,01$
B:C $P < 0,05$

Tabelle 13:

Einfluß von DIP auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose

DIP 0 mM	DIP 0,1 mM	DIP 0,5 mM	DIP 1,0 mM
66,6±7,06 (6)	86,1±20,21 (7)	84,85±6,99 (7)	92,0±11,67 (4)

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / 60 Minuten
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern

Statistische Auswertung: Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

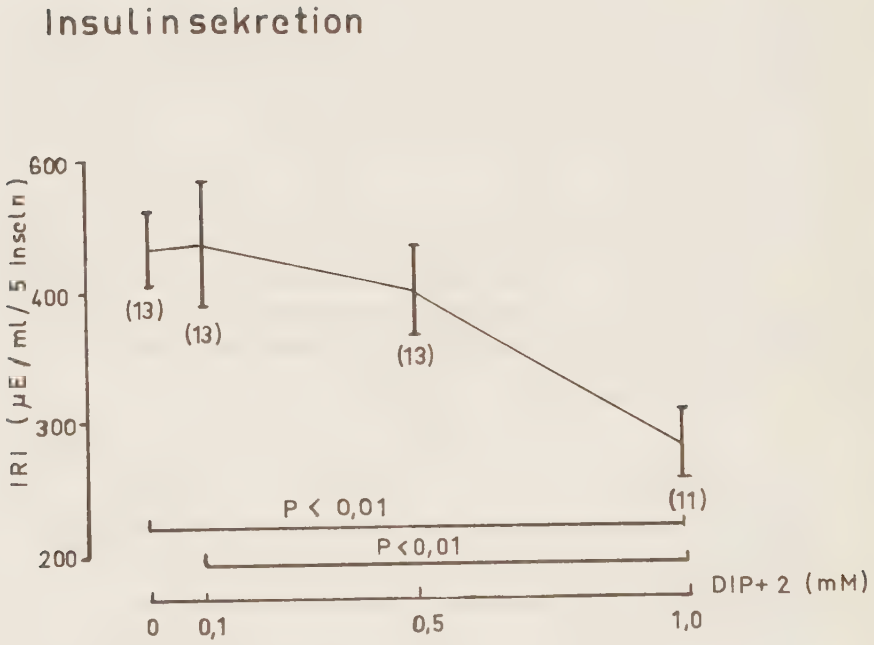


Abb. 20:

Einfluß von DIP+2 auf die Glucose (3mg/ml) induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 60 Minuten inkubiert.
Mittelwerte± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern

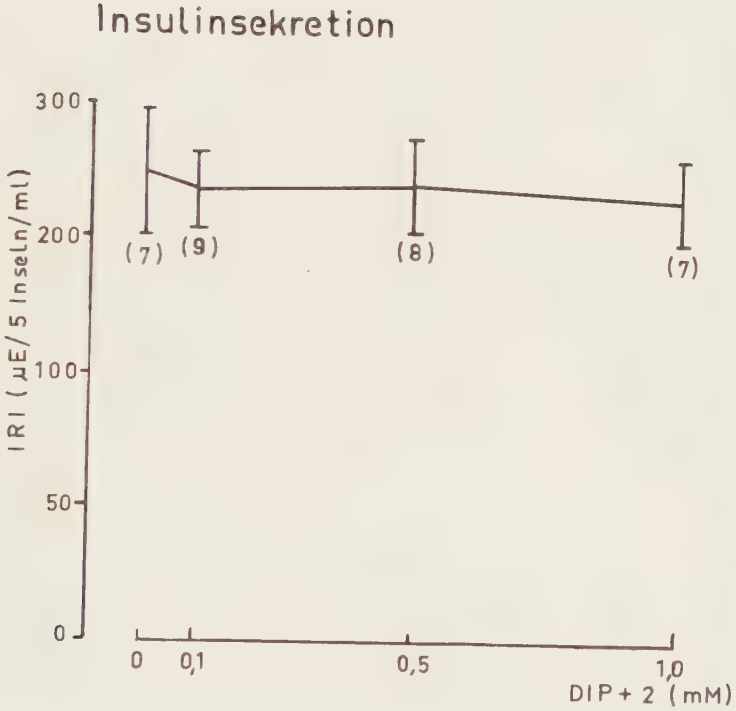


Abb. 21:

Einfluß von DIP+2 auf die Glucose (2 mg/ml) induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 60 Minuten inkubiert.

Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern

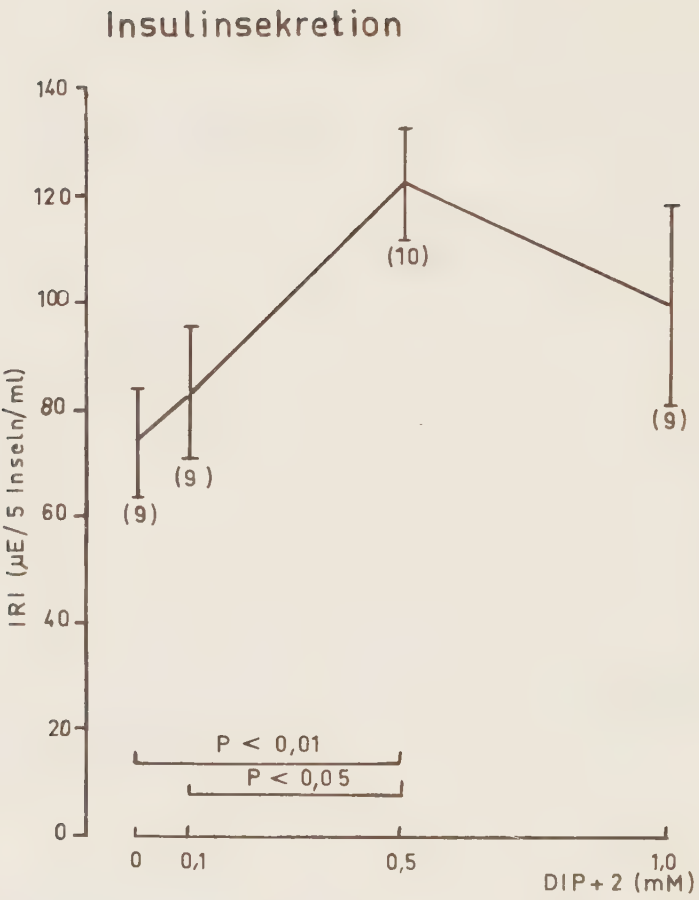


Abb. 22:

Einfluß von DIP+2 auf die Glucose (1 mg/ml) induzierte Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln der Ratte.

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 60 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern.

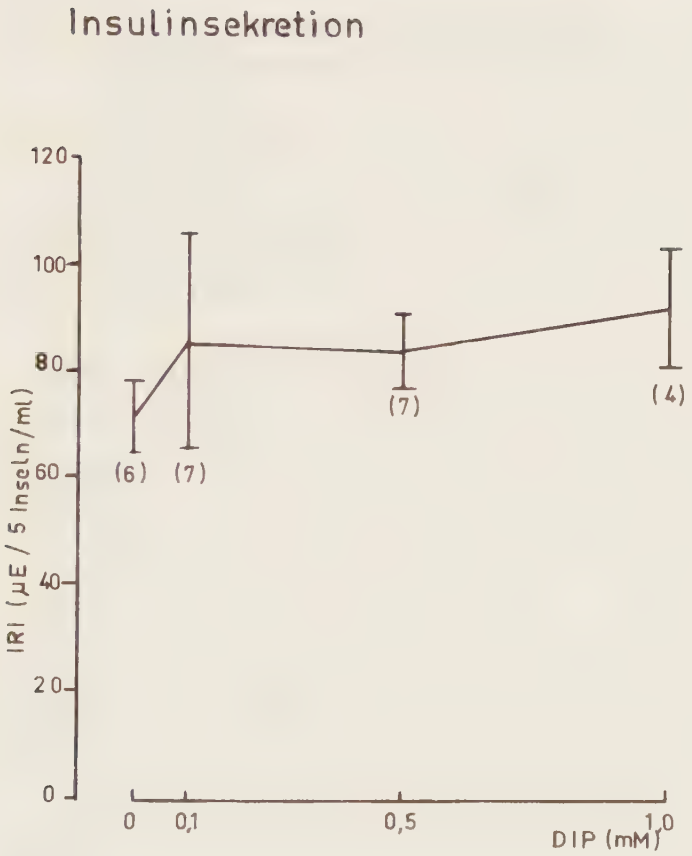


Abb. 23:

Einfluß von DIP auf die Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg / ml Glucose.

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 60 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche in Klammern.

3.1.3 Einfluß von DIP und DIP+2 auf die durch p-CMB induzierte Insulinsekretion isolierter Rattenpankreasinseln.

Von Ammon und Akhtar konnte am isoliert perfundierten Rattenpankreas gezeigt werden, daß die durch p-CMB induzierte Sekretion von Insulin gehemmt ist, wenn man dem Präperfusat und Perfusat 0,1 mM des Azoesters Diamid zusetzt (31,13).

Es sollte hier untersucht werden, ob auch am Modell der isolierten Langerhansschen Insel der Ratte die p-CMB induzierte Sekretion durch die nicht membrangängige Azoverbindung DIP+2 und durch die membrangängige Verbindung DIP gehemmt werden kann.

Wie die Abbildungen 24 und 25 und die Tabellen 14 und 15 zeigen, ist dies nicht der Fall. 0,5 mM p-CMB lösten bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten eine Sekretion von 274 µE Insulin aus. Durch Zusatz von 0,1; 0,5 und 1,0 mM DIP war ein geringer Anstieg um 107 bis 144 µE zu verzeichnen, der bei der Konzentration von 1,0 mM DIP statistisch knapp signifikant war (Abb.24 und Tab.14).

Aus Abb.25 und Tab. 15 geht hervor, daß DIP+2 in den gleichen molaren Konzentrationen keinen Einfluß auf die durch 0,5 mM p-CMB hervorgerufene Insulinsekretion ausübt.

Tabelle 14:

Einfluß von DIP auf die durch p-CMB (0,5 mM) ausgelöste Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose.

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 1 mg/ml + p-CMB 0,5 mM			
	DIP 0 mM	DIP 0,1 mM	DIP 0,5 mM	DIP 1,0 mM
78,8 ± 3,83 (20)	352,7±45,61 (26)	460,5±49,56 (23)	463,75±51,43 (20)	497,5±55,18 (19)
A	B	C	D	E

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / ml / 60 Minuten
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern
Statistische Auswertung: A:B $P < 0,001$ A:E $P < 0,001$
A:C $P < 0,001$ B:E $P < 0,05$
A:D $P < 0,001$

Alle anderen Mittelwerte sind nicht signifikant voneinander verschieden.

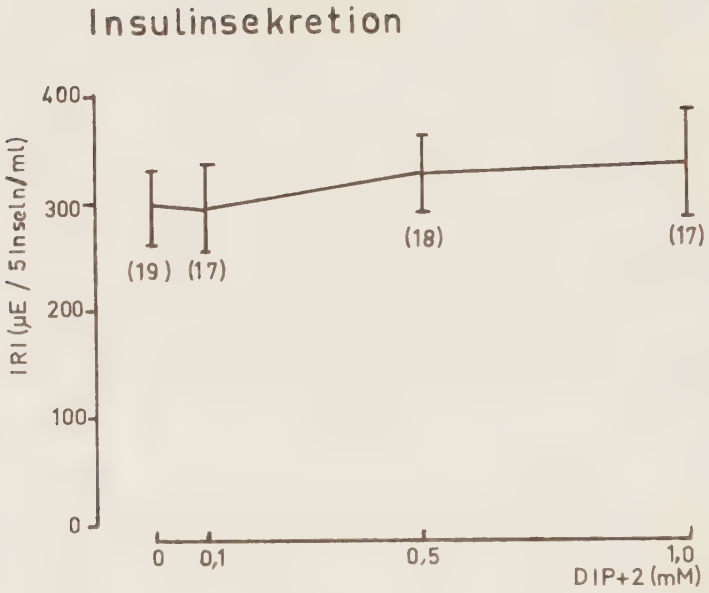


Abb. 24:

Einfluß von DIP auf die durch p-CMB (0,5 mM) ausgelöste Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 60 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche in Klammern.

Tabelle 15:

Einfluß von DIP+2 auf die durch p-CMB (0,5 mM) ausgelöste Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose.

Kontrolle Glucose 1mg/ml	Glucose 1 mg/ml + p-CMB 0,5 mM			
	DIP+2 0 mM	DIP+2 0,1 mM	DIP+2 0,5 mM	DIP+2 1,0 mM
54,61 ± 8,49 (13)	239,8±30,86 (19)	234,12±31,58 (17)	263,22±28,79 (18)	266,9±39,21 (17)
A	B	C	D	E

Angaben in µE IRI / 5 Inseln / ml / 60 Minuten
Mittelwerte ± SEM
Anzahl der Versuche in Klammern.
Statistische Auswertung: A:B $P < 0{,}001$ A:D $P < 0{,}001$
A:C $P < 0{,}001$ A:E $P < 0{,}001$
Alle anderen Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

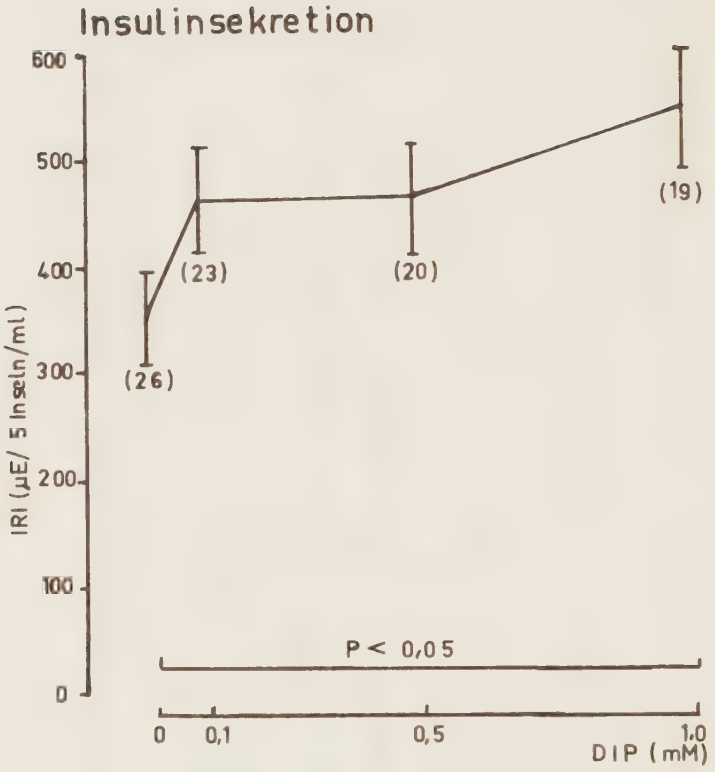


Abb. 25:

Einfluß von DIP+2 auf die durch p-CMB (0,5 mM) ausgelöste Insulinsekretion Langerhansscher Inseln der Ratte.

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 60 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche in Klammern.

3.2 Einfluß von Leucin auf den GSH- und GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte.

Um die Ergebnisse mit Befunden anderer Untersuchungen des Arbeitskreises korrelieren zu können, wurde die Inkubationszeit in dieser Versuchsreihe auf 90 Minuten festgelegt. Eine Verfälschung des Ergebnisses durch einen möglichen negativen Feedback-Mechanismus infolge Anhäufung sezernierten Insulins im Medium wurde durch Zugabe von Insulin-Antikörperlösung mit einer Bindungskapazität von 1000 µE Insulin verhindert.

Untersuchungen über den Einfluß von Leucin auf den Gehalt isolierter Rattenpankreasinseln an GSH und GSSG ergaben, wie aus Abb. 26 und Tab. 16 hervorgeht, daß 10 mM Leucin in Gegenwart von 5,6 mM Glucose zu einem signifikanten Anstieg des Gehalts an reduziertem Glutathion um 21,72 pmol von 34,00 pmol (5,6 mM Glucose alleine) auf 55,72 pmol pro 10 Inseln führen.

Der insuläre GSSG-Gehalt sinkt von 32,3 pmol auf 16,78 pmol; der GSH/GSSG-Quotient steigt dementsprechend von 0,52 (5,6 mM Glucose alleine) auf 1,66 (5,6 mM Glucose + 10 mM Leucin).

Tabelle 16:

Einfluß von Leucin auf den GSH- und GSSG-Gehalt, sowie den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte.

	Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Leucin 10,0 mM
GSH	34,00 ± 2,84 (19) A	55,72 ± 8,55 (18) B
GSSG	32,30 ± 4,41 (17) C	16,78 ± 2,38 (13) D
$\frac{GSH}{GSSG}$*	0,52	1,66

Angaben in pmol GSH bzw. GSSG / 10 Inseln

* Zur Berechnung der Quotienten wurden die GSSG-Werte als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche in Klammern.

Statistische Auswertung: A:B $P < 0,02$

C:D $P < 0,01$

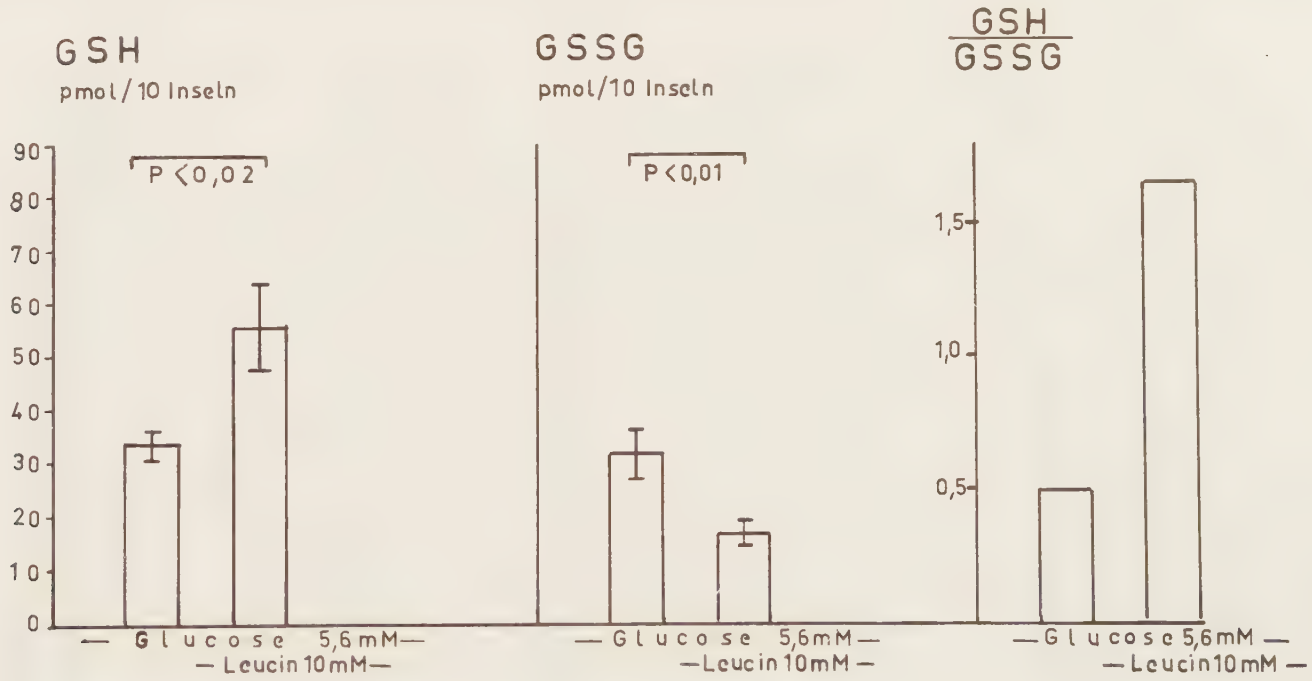


Abb. 26:

Einfluß von Leucin auf den GSH-, GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 1 mg / ml Glucose.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche 13 - 19.

3.3 Einfluß des Alters auf den GSH- und GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte

3.3.1 Stimulation mit Glucose

Auch in dieser Versuchsreihe betrug die Inkubationsdauer 90 Minuten, es wurde wieder Insulin-Antikörperlösung mit einer Bindungskapazität von 1000 µE / ml dem Inkubationsmedium zugesetzt.

Aus Abb. 27 und Tab. 17 geht hervor, daß bei Pankreasinseln junger Ratten der GSH-Gehalt von 34,00 pmol in Gegenwart von 5,6mM Glucose auf 50,22 pmol in Gegenwart von 16,7 mM Glucose ansteigt. Der insuläre GSH-Gehalt zwei Jahre alter Ratten lag in Gegenwart von 5,6 mM Glucose deutlich höher als bei jungen Tieren (49,46 gegenüber 34,00 pmol), ein Anstieg in Gegenwart einer erhöhten Glucosekonzentration konnte nicht beobachtet werden, der GSH-Gehalt betrug dann 48,42 pmol/10 Inseln.

Analoge Beobachtungen wurden bei der Untersuchung des Gehalts an oxidiertem Glutathion Langerhansscher Inseln zwei Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen Tieren gemacht (Abb. 28 und Tab 17): Während der GSSG-Gehalt bei den jungen Tieren von 32,30 pmol in Gegenwart von 5,6 mM Glucose auf 17,5 pmol in Gegenwart von 16,7 mM Glucose fiel, war bei

den gealterten Ratten kein Unterschied zwischen hoher und niederer Glucosekonzentration festzustellen, die Werte betrugen 27,92 pmol (5,6 mM Glucose) gegenüber 27,4 pmol (16,7 mM Glucose).

Dementsprechend stieg der GSH/GSSG-Quotient der Inseln junger Tiere von 0,52 (5,6 mM Glucose) auf 1,69 (16,7 mM Glucose), während er bei alten Tieren konstant auf 0,88 blieb (Abb. 29 und Tab. 17).

Im Gesamtglutathiongehalt (GSH+GSSG) war dagegen weder zwischen hoher und niederer Glucosekonzentration noch zwischen alten und jungen Tieren ein deutlicher Unterschied zu sehen.

Tabelle 17:

Einfluß des Alters auf GSH-, GSSG- und Gesamtglutathiongehalt sowie den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von 5,6 bzw. 16,7 mM Glucose.

		Glucose 5,6 mM	Glucose 16,7 mM
GSH	jung	34,00±2,84 (20) A	59,22±7,64 (20) E
	alt	49,46±6,95 (23) B	48,42±6,16 (21) F
GSSG	jung	30,30±4,41 (17) C	17,50±1,88 (12) G
	alt	27,92±3,46 (17) D	27,40±3,41 (17) H
GSH+ GSSG*	jung	98,6	94,22
	alt	105,3	103,22
$\frac{GSH}{GSSG^*}$	jung	0,52	1,69
	alt	0,88	0,88

Angaben in pmol GSH bzw. GSSG/10 Inseln, die mit*bezeichneten GSSG-Werte wurden als pmol GSH berechnet(1pmol GSSG ≙ 2pmol GSH). Mittelwerte±SEM, Anzahl der Versuche in Klammern. Statistische Auswertung: A:E $P < 0,005$; C:G $P < 0,02$; alle anderen Mittelwerte sind nicht signifikant voneinander verschieden.

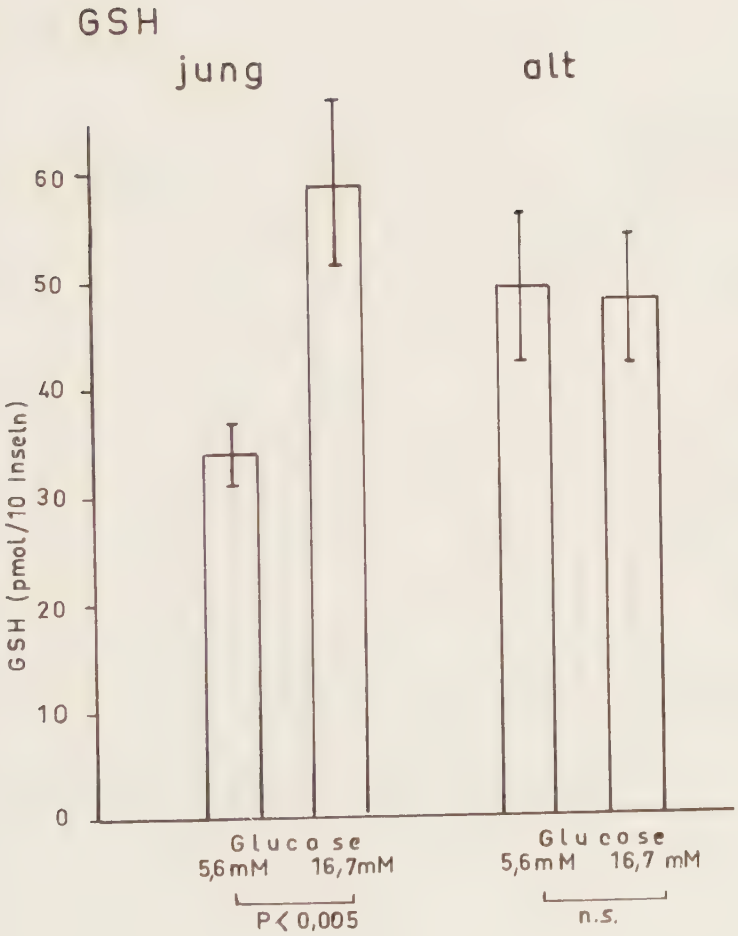


Abb. 27:

Einfluß des Alters auf den GSH-Gehalt isolierter Rattenpankreasinseln in Gegenwart von 5,6 bzw. 16,7 mM Glucose. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten inkubiert. Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche 19 - 23.

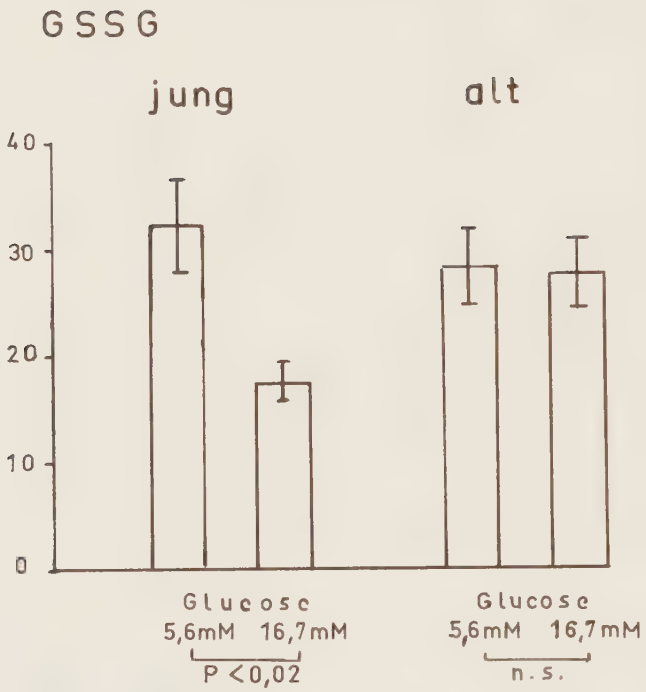


Abb. 28:

Einfluß des Alters auf den Gehalt an GSSG isolierter Pankreasinseln der Ratte in Gegenwart von 5,6 bzw. 16,7 mM Glucose.

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche 12 - 17.

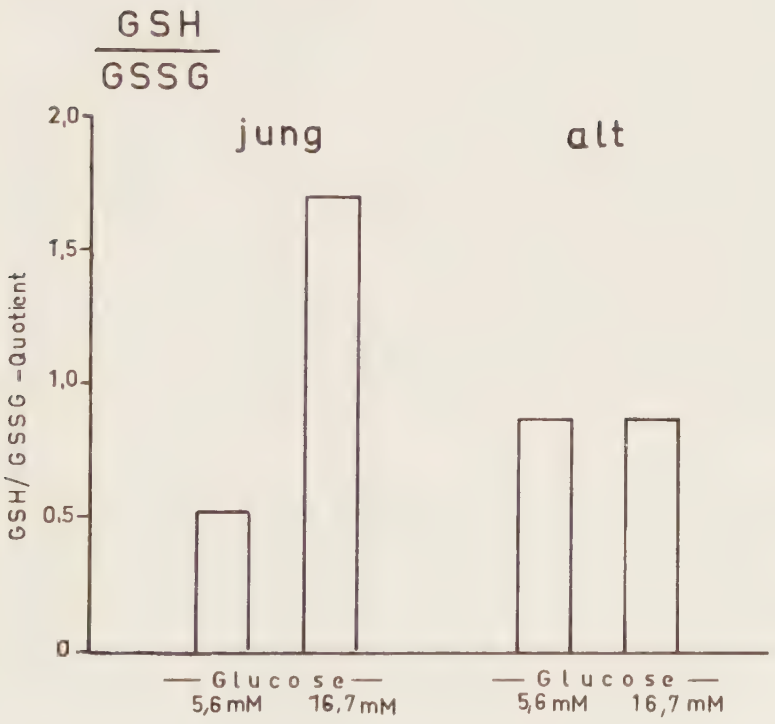


Abb. 29:

Einfluß des Alters auf den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,6 bzw. 16,7 mM Glucose.

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden der Tabelle 17 entnommen. Die GSSG-Werte wurden als pmol GSH berechnet. (1 pmol GSSG $\hat{=}$ 2 pmol GSH).

3.3.2 Stimulation mit Leucin

Auch bei der Stimulation mit 10 mM Leucin wurden bei 90-minütiger Inkubation in Gegenwart von Insulinantikörpern (Bindungskapazität 1000 µE/ml) ähnliche Unterschiede im insulären Glutathionstoffwechsel alter und junger Tiere festgestellt, wie bei der Stimulation mit Glucose (Abb.30 und Tab. 18): Der Gehalt an reduziertem Glutathion stieg bei den jungen Tieren von 34,00 pmol (5,6 mM Glucose alleine) auf 55,72 pmol (5,6 mM Glucose + 10 mM Leucin) an, bei den Inseln alter Tiere bewirkten 10 mM Leucin keine Veränderung im GSH-Gehalt, die Werte betrugen 49,46 und 43,15 pmol.

Bei der Glucosekonzentration von 5,6 mM führten 10 mM Leucin bei Inseln junger Ratten zu einer signifikanten Abnahme des Gehalts an oxidiertem Glutathion (Abb. 31, Tab. 18) von 32,30 auf 16,78 pmol, der GSSG-Gehalt alter Ratten wurde durch 10 mM Leucin nicht signifikant verändert.
Der Anstieg des insulären GSH/GSSG-Quotienten betrug bei den jungen Tieren 1,14 (von 0,52 auf 1,66), bei den alten Tieren war praktisch keine Veränderung festzustellen, der Quotient stieg durch 10 mM Leucin nur um 0,06 (von 0,88 auf 0,94) an (Abb. 32, Tab. 18).
Wie der gleichen Tabelle zu entnehmen ist, ergeben sich bei der Berechnung des Gesamtglutathiongehaltes (GSH + GSSG) keine signifikanten Unterschiede durch den Zusatz von 10 mM Leucin zum Inkubationsmedium.

Tabelle 18:

Einfluß des Alters auf den GSH-, GSSG- und Gesamtglutathiongehalt, sowie auf den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Rattenpankreasinseln in Gegenwart von 5,6 mM Glucose bzw. 5,6 mM Glucose + 10 mM Leucin

		Glucose 5,6 mM	Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM
GSH	jung	34,00±2,84 (19) A	55,72±8,55 (18) E
	alt	49,46±6,95 (23) B	43,15±4,75 (19) F
GSSG	jung	32,30±4,41 (17) C	16,78±2,38 (13) G
	alt	27,92±3,46 (17) D	22,91±3,09 (16) H
GSH+ GSSG*	jung	98,6	105,3
	alt	89,28	88,96
$\frac{GSH}{GSSG^*}$	jung	0,52	1,66
	alt	0,88	0,94

Angaben in pmol GSH bzw. GSSG/10 Inseln, die mit*bezeichneten GSSG-Werte wurden als pmol GSH berechnet(1pmol GSSG ≙2pmol GSH). Mittelwerte±SEM, Anzahl der Versuche in Klammern.
Statistische Auswertung: A:E $P < 0,02$; C:G $P < 0,01$, alle anderen Mittelwerte sind nicht signifikant unterschiedlich.

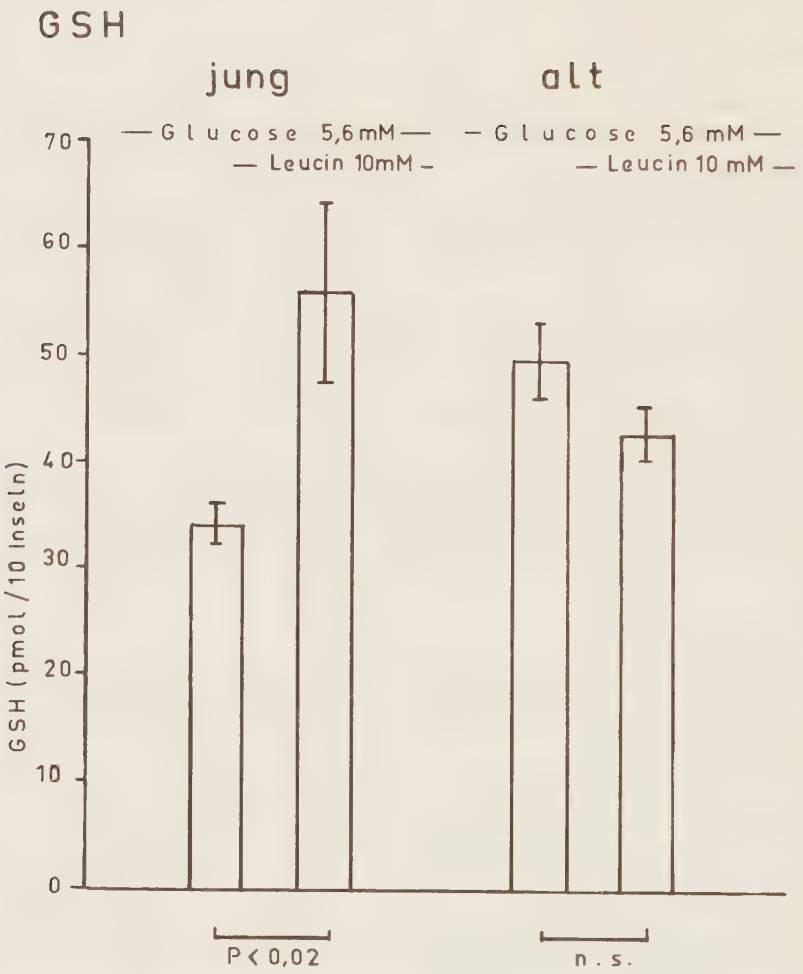


Abb. 30:

Einfluß des Alters auf den Gehalt an GSH isolierter Rattenpankreasinseln in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose bzw. 1 mg/ml Glucose + 10 mM Leucin.

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche 18 - 23.

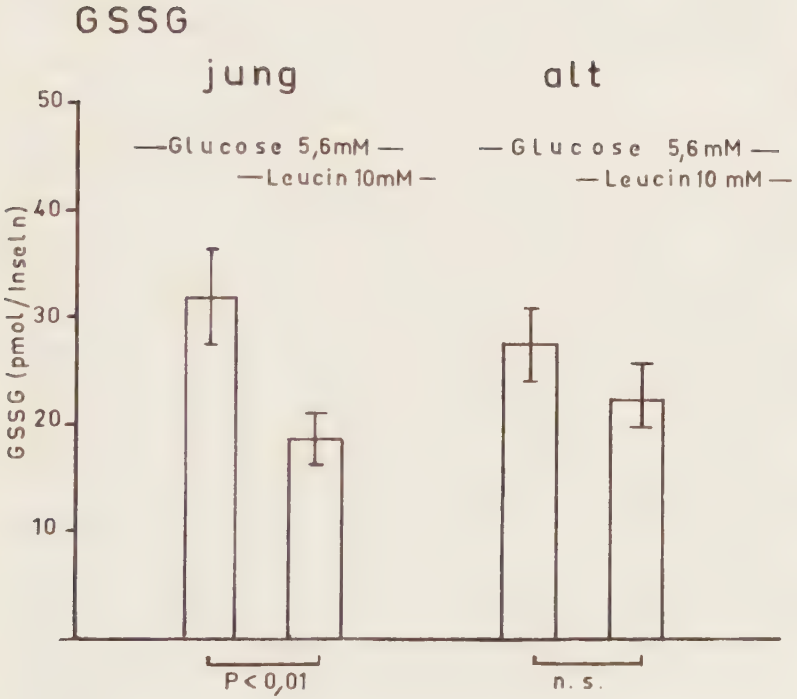


Abb. 31:

Einfluß des Alters auf den Gehalt an GSSG isolierter Rattenpankreasinseln in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose bzw. 1 mg/ml Glucose + 10 mM Leucin.

Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Minuten inkubiert.
Mittelwerte ± SEM,
Anzahl der Versuche 13 - 17.

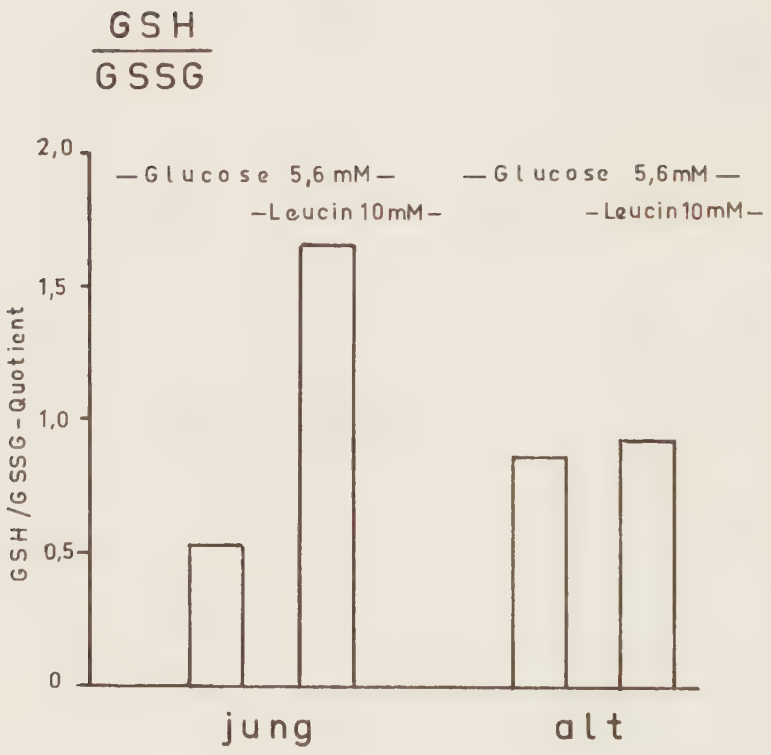


Abb. 32:

Einfluß des Alters auf den GSH/GSSG-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte in Gegenwart von 5,6 mM Glucose bzw. 5,6 mM Glucose + 10 mM Leucin.

Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden der Tabelle 17 entnommen. Die GSSG-Werte wurden als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

4. DISKUSSION

4.1 Membranständige SH-Gruppen, intrazellulärer GSH/GSSG-Quotient und Insulinsekretion

Auf die Bedeutung des Pentose-Phosphat-Stoffwechsels und des NADPH-Spiegels Langerhansscher Inseln bei der Sekretion von Insulin wurde einleitend bereits hingewiesen. Ashcroft und Mitarbeiter schlossen allerdings aufgrund von Untersuchungen an Inselhomogenaten, nach denen bei Zusatz von NADPH die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase erniedrigt ist, daß die Aktivität des PPS bei erhöhtem NADPH-Spiegel gehemmt wird (46). Dem stehen jedoch Untersuchungen an intakten Inseln entgegen, nach denen mit steigender Glucosekonzentration sowohl die Aktivität des PPS als auch der NADPH/NADP-Quotient erhöht ist (5,8). Es muß daher angenommen werden, daß nicht dieser Quotient allein den PPS reguliert, sondern daß die Insel über weitere übergeordnete Steuerungsfaktoren verfügt.

NADPH dient im Cytoplasma als Wasserstoffdonator für NADPH-abhängige Reductasen. Eine seiner wichtigsten Funktionen betrifft die Aufrechterhaltung eines gewissen Redox-Zustandes im GSH/GSSG-System, indem es mit Hilfe des Enzyms Glutathionreductase GSSG zu GSH reduziert.

Dem Tripeptid Glutathion kommt im Zellstoffwechsel eine

zentrale Stellung zu. Seine physiologische Bedeutung beruht in erster Linie auf seiner Eigenschaft als Redox-System, das nach dem Prinzip der reversiblen Bindung zweier Glutathionmoleküle über eine Disulfidbrücke arbeitet:

$$GSG + GSH \longrightarrow GSSG + 2H$$

Meister et al. schreiben dem Glutathion eine Bedeutung beim Transport von Aminosäuren in die Zelle zu (γ - Glutamylzyklus (47)), auch bei der Freisetzung von Neurotransmittersubstanzen (48,49) und bei der Entgiftung von toxischen Stoffen (50,51) scheint es eine wichtige Rolle zu spielen. Eine wichtige Funktion hat Glutathion auch für die intrazelluläre Proteinsynthese (52,53).

Durch Oxidation entstehendes GSSG wird laufend wieder enzymatisch reduziert, dadurch wird ständig ein bestimmter GSH/GSSG-Quotient der Zelle aufrechterhalten. Von diesem Thiol-Disulfid-Status sind viele Stoffwechselschritte abhängig. So wird die Aktivität von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels über die Bildung von gemischten Disulfiden mit niedermolekularen Thiolen (GSH) beeinflußt (54,55). Man vermutet, daß diese Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen Konformationsänderungen am inaktiven Enzym bewirken, wodurch die aktive Form des Enzyms entsteht (55). Von verschiedener Seite wurde berichtet, daß ein veränderter Redoxzustand des GSH/GSSG-Systems veränderte Membraneigenschaften zur Folge hat: So werden u.a. der Transport von Ionen durch Membranen (56), die Freisetzung lysosomaler

Enzyme (57) und die Funktion der Mitochondrienmembranen (58) durch den GSH/GSSG-Quotienten beeinflußt. Wird das GSH/GSSG Gleichgewicht zur oxidierten Seite hin verschoben, so sind Membranschäden, vor allem infolge nicht mehr eliminierter Peroxide (GSH fungiert als Substrat der Glutathionperoxidase) die Folge (59).

Verschiedene Befunde sprechen dafür, daß dem GSH/GSSG-Gleichgewicht auch in der Langerhansschen Insel bei der Sekretion von Insulin eine Bedeutung zukommt:

So konnte in unserem Labor gezeigt werden, daß der NADPH/NADP-Quotient mit dem GSH/GSSG-Quotient der Pankreasinsel korreliert, beide Parameter sind, wie die Sekretion von Insulin und die Aktivität des PPS, von der Glucosekonzentration abhängig (8,5). Eine experimentelle Senkung des GSH/GSSG-Quotienten durch Diamid (einem Oxidans für GSH) oder t-BHP (einem Substrat der Glutathionperoxidase) führen zur Hemmung der Insulinsekretion (13).
Auf eine Beteiligung von SH-Gruppen in der Membran der ß-Zelle beim Freisetzungsmechanismus wurde schon früher von verschiedenen Arbeitsgruppen hingewiesen (13,60,61). Die Hypothese gründet sich vor allem auf Beobachtungen, daß mit Thiolreagenzien, die nicht in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren und zu einer Abnahme membranständiger SH-Gruppen führen, eine Sekretion von Insulin ausgelöst werden kann (61). So könnte man die stimulatorische Wirkung

von p-CMB, das kaum durch die Zellmembran dringt, dadurch erklären, daß es unter Bildung reversibler Mercaptide mit freien Thiolgruppen der Zellmembran reagiert. Auch durch die Thiolreagenzien 5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) und Bis-(5-carboxy-2-pyridyl)disulfid (DTNB und CPDS) kann eine Sekretion von Insulin ausgelöst werden (62). Man nimmt an, daß diese beiden dimeren Disulfidreagenzien S-S-Brücken zwischen Reagenz und Membran bzw. zwischen benachbarten Membran-SH-Gruppen ausbilden und so ebenfalls die Anzahl der membranständigen SH-Gruppen senken, wobei die dimeren Moleküle zu monomeren Anionen reduziert werden (63,64). Auch für diese Verbindungen konnte man zeigen, daß sie infolge ihrer hohen Elektronegativität nicht in der Lage sind, rasch in die Zelle einzudringen (63).

Es sieht also bisher so aus, daß Thiolreagenzien, die die Zellmembran nicht permeieren und die Insulinfreisetzung stimulieren, für ihre Wirkung freie SH-Gruppen auf der Membran benötigen.

Für die Sulfonylharnstoffverbindung Tolbutamid wird ebenfalls eine Wechselwirkung mit Membran-SH-Gruppen diskutiert, obwohl dies allerdings chemisch schwer zu begründen ist (65) . Tolbutamid steigert die Wirkung stimulatorischer Glucosemengen auf die Insulinsekretion (66), eine Permeation durch Zellmembranen konnte nicht nachgewiesen werden (67).

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß auch die Insulin freisetzende Wirkung von Tolbutamid vom intrazellulären Redoxzustand des NADPH/NADP- und des GSH/GSSG-Systems abhängig ist (68).

Hellman und Mitarbeiter untersuchten weitere Thiolreagenzien, die in Wechselwirkung mit Membran-SH-Gruppen treten: Jodacetamid (JAA) führt in niederen Konzentrationen zur Sekretion von Insulin, man erklärt die Wirkung, die allerdings an die gleichzeitige Anwesenheit von Glucose gebunden ist, mit einer Alkylierung von Membran-SH-Gruppen (69). In höheren Dosen wird die Insulinsekretion durch JAA gesenkt, da dann eine zu große Menge des Stoffes die Plasmamembran passiert, so daß intrazellulär die Glycolyse gehemmt wird (69).

Auch halogenierte Hexosamine führen zur Freisetzung von Insulin, indem sie oberflächliche SH-Gruppen der ß-Zellmembran alkylieren, ihre Wirkung ist z.T. unabhängig von der gleichzeitigen Anwesenheit von Glucose (70).

Ausgehend von der Tatsache, daß einige Stimulantien, deren Wirkung auf Reaktionen mit Membran-SH-Gruppen zurückgeführt wird, die Anwesenheit von Glucose benötigen (z.B. JAA und Tolbutamid), andere jedoch auch ohne Glucose stimulieren, schließt Hellman, daß die unterschiedlichen Stimulantien ihre sekretorische Wirkung möglicherweise über verschiedene Klassen von SH-Gruppen vermitteln (62).

In der hier vorliegenden Arbeit sollte der schon früher geäußerten Vermutung, daß Thiolgruppen der Zellmembran, die etwas mit der Insulinsekretion zu tun haben, zumindest teilweise mit intrazellulärem GSH im Gleichgewicht stehen, weiter nachgegangen werden.

Ausgehend von der Beobachtung, daß Diamid, von dem man weiß, daß es Zellmembranen schnell permeieren kann (12), sowohl den GSH/GSSG-Quotienten, als auch die durch Glucose und andere Stimulantien hervorgerufene Insulinsekretion senkt (68,13,32), versuchten wir, pharmakologische Hilfsstoffe einzusetzen, die gegenüber GSH die gleiche chemische Reaktivität aufweisen, die jedoch eine Unterscheidung zwischen intrazellulärer und extrazellulärer SH-Oxidation machen.

Kosower zeigte an Erythrocyten, daß eine solche Unterscheidung möglich ist (18). Diazodicarbonsäure-bis-(N'-dimethylpiperazid)(DIP) gehört wie Diamid der chemischen Substanzklasse der Azoester an, durch reduziertes Glutathion wird diese Substanz zur Hydrazoverbindung reduziert, GSH wird dabei zum Disulfid GSSG oxidiert. Quarternisiert man nun die beiden Stickstoffatome der DIP-Verbindung durch Anlagerung einer Methylgruppe mit Hilfe von Methyljodid, so kann man die Substanz in ein hydrophiles Dijodsalz (DIP+2 = DIP-Salz) überführen. Auf diese Weise verliert die Verbindung ihre Fähigkeit, die Lipoidbarriere der Zellmembran zu überwinden (18), an ihrer chemischen Reaktionsfähigkeit

gegenüber GSH ändert sich dadurch nichts, die für die Reaktion mit reduziertem Glutathion ausschlaggebende Azogruppierung bleibt ja erhalten.

Wir haben diese chemische Reaktionsfähigkeit von DIP bzw. DIP-Salz mit GSH in vitro überprüft, Abb. 8 und 9 zeigen, daß sowohl DIP als auch DIP-Salz in stöchiometrischen Mengen reduziertes Glutathion oxidieren.

Obwohl wir die Aufnahme von DIP bzw. DIP-Salz nicht gemessen haben, können wir aufgrund der Tatsache, daß DIP den GSH/GSSG-Quotienten senkt (Abb. 13), DIP-Salz jedoch zu keiner Änderung führt, schließen, daß DIP in der Tat die Zellmembran permeiert hat, während DIP-Salz diese Eigenschaft mit großer Wahrscheinlichkeit nicht besitzt.

Beim Einsatz eines jeden in der Pharmakologie verwendeten Hilfsstoffs stellt sich natürlich die Frage nach seiner Toxizität. Für die Azoester wie Diamid und DIP liegen dazu folgende Befunde vor: Bei Erythrocyten ist es erst bei 50-fachen stöchiometrischen Mengen zu Zellschädigungen gekommen (10), die Erythrocyten sind auch in der Lage, durch Azoverbindungen zu GSSG oxidiertes GSH wieder zu regenerieren, sofern den Zellen ausreichend Glucose zur Verfügung steht (10). Eine von Kosower und Mitarbeitern beschriebene Hemmung der Proteinsynthese (sie verwendeten die Azoverbindung in einer Konzentration von 1-3 mM) war reversibel,

wenn man den Zellen wieder in genügenden Mengen GSH zur Verfügung stellte (71,72). Der Mangel an reduziertem Glutathion alleine muß nicht zwangsläufig Zellschädigung bzw. Zelluntergang bedeuten, Oxidationen von Protein-SH-Gruppen und Eiweißdenaturierungen traten in erster Linie erst dann auf, wenn eine Steigerung oxidativer Vorgänge durch Radikale, Metabolite von Medikamenten oder Hydro- und Lipidperoxide ausgelöst wurde (73). In Untersuchungen an Erythrocyten, Lymphocyten und Myeloblasten konnte gezeigt werden, daß eine direkte Schädigung der Zellmembran nur bei starker Radikalentwicklung durch mehrfachen Überschuß von Azoestern im Inkubationsmedium möglich ist (73, 74).

Was die Wirkung von DIP und DIP-Salz auf den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten betrifft, ergab sich folgendes: Bereits in einer Konzentration von 0,1 mM senkte die membrangängige Substanz DIP den intrazellulären GSH-Spiegel signifikant, während bei DIP-Salz kein Einfluß auf den Gehalt an reduziertem Glutathion meßbar war. Höhere Dosen von DIP führten zu einer weiteren, dosisabhängigen Senkung des GSH-Gehalts, DIP-Salz zeigte wiederum keine Wirkung (Abb. 11-16; Tab. 1-6).

Die Abbildung 12 und Tabelle 2 zeigen, daß unter Verwendung von DIP der GSSG-Anstieg nicht proportional zum GSH-Abfall ist; dies könnte damit erklärt werden, daß GSSG in höheren Konzentrationen eine negative Wirkung auf den Stoffwechsel

der Zelle ausübt, indem intrazelluläre Enzyme gehemmt werden (75). So konnte man an verschiedenen Modellen nachweisen, daß die Zelle bestrebt ist, „überschüssiges" GSSG aus dem Intrazellulärraum zu entfernen. An der perfundierten Rattenleber wurde gezeigt, daß bei intrazellulärer Akkumulation von GSSG die Leberzellen vermehrt GSSG an das Perfusat abgeben, wobei es sich um einen Entgiftungsmechanismus der Leberzellen handeln könnte (76). Srivastava et al. machten ähnliche Beobachtungen an Erythrocyten, sie nehmen an, daß GSSG über einen energieabhängigen Prozess aus den roten Blutkörperchen geschleust wird (75,77). Auch an der Augenlinse des Kaninchens wurde nach Oxidation des GSH zu GSSG eine Abgabe von GSSG an das Kammerwasser gemessen (78).
Ob auch die Inselzelle intrazellulär akkumuliertes GSSG an das Medium abgibt, wurde bislang nicht untersucht, eine solche Möglichkeit ist jedoch grundsätzlich nicht auszuschließen.
Eine weitere Erklärung für den nur geringen Anstieg des GSSG bei experimenteller Senkung des GSH-Gehalts könnte darin gefunden werden, daß nicht jedes GSH-Molekül bei seiner Oxidation zwangsläufig in GSSG übergeführt werden muß, sondern daß bei diesem Oxidationsvorgang auch gemischte Disulfide (GSH tritt in Wechselwirkung mit SH-Gruppen von Enzymen und Strukturproteinen) entstehen können (79,80). Die Bildung reversibel gemischter Disulfide wird allgemein als Möglichkeit der Regulation von Enzymaktivitäten und Stoffwechselwegen diskutiert (54).

Berichten von Beutler und West, nach denen die von Hissin und Hilf beschriebene Bestimmungsmethode für GSSG (43) an Lebergewebe zu hohe Werte liefert, da angeblich auch andere Substanzen bei pH 12 mit OPT fluoreszieren (45), steht bei unseren Versuchen entgegen, daß in Pankreasgewebe die Cycling-Methode nach Tietze (44) und die fluorimetrische Methode nach Hissin und Hilf (43) übereinstimmende Werte ergeben (68). Sollten die von Beutler und West gemachten Beobachtungen auch für Pankreasinseln zutreffen, so hätten wir bei der Bestimmung von GSSG nach Oxidation des intrazellulären GSH weit höhere Werte finden müssen.

Nachdem die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, daß DIP zu einem Abfall des GSH/GSSG-Quotienten führt, DIP-Salz dagegen nicht, wurde nun geprüft, ob sich daraus Unterschiede bei der Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose ergeben.
Zunächst zeigte sich, daß nach nur 15 minütiger Inkubationszeit (die gleiche Zeit wie bei der Bestimmung von GSH und GSSG) weder mit DIP noch mit DIP-Salz ein Effekt auf die durch 3 mg/ml Glucose freigesetzte Menge an Insulin festzustellen war, obwohl der GSH-Spiegel nach diesem Zeitraum bereits deutlich gesenkt war (Abb. 17 und 18). Dies kann methodisch bedingt sein. Aus Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe ergibt sich, daß z.B. die hemmende Wirkung von Diamid, Methylenblau oder t-BHP beim isoliert perfundierten Pankreas dann deutlich hervortrat, wenn diese Stoffe bereits 20 Minuten vor der eigentlichen Glucosezufuhr präperfundiert wurden.

Es ist daher denkbar, daß auch bei isolierten Inseln eine gewisse Zeit der Einwirkung erforderlich ist, ehe es zu einer Beeinflussung der durch Glucose hervorgerufenen Insulinsekretion kommt. Für diese Auffassung sprechen auch unsere Befunde nach 60 Minuten:
Hierbei zeigt sich, daß die lipophile, membrangängige Substanz DIP die durch 16,7 mM ausgelöste Insulinsekretion dosisabhängig senkt, während das hydrophile, nicht membrangängige DIP-Salz in äquimolaren Mengen in niederen Konzentrationen keinen Effekt hatte (Abb. 19 und 20; Tab. 9 und 10). Bei der relativ hohen Konzentration von 1,0 mM DIP-Salz war eine statistisch knapp signifikante Hemmung zu verzeichnen, die man damit erklären kann, daß bei dieser Konzentration und bei 60-minütiger Inkubationszeit eine geringe Menge des Stoffes permeiert sein und den intrazellulären GSH-Gehalt der Insel doch leicht herabgesetzt haben könnte.

Unsere Ergebnisse legen somit den Schluß nahe, daß diese Azoester die durch Glucose induzierte Insulinsekretion nur dann hemmen, wenn sie die Zellmembran permeieren und den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten senken.

Wie erwähnt führen Thiolreagenzien, die die Plasmamembran nicht passieren, wie p-CMB, DTNB und CPDS durch ihre Reaktion mit oberflächlichen Membran-SH-Gruppen zum Anstieg der Insulinsekretion (61,62). Eine derartige Stimulation

bzw. eine Verstärkung der Glucosewirkung lag auch bei der ebenfalls nicht membrangängigen Verbindung DIP-Salz im Bereich des Möglichen, wenngleich Kosower berichtet (11), daß Azoverbindungen bevorzugt mit kleinen SH-haltigen Molekülen wie Cystein und GSH reagieren, weniger dagegen mit Protein-SH-Gruppen. Wir überprüften daher, ob DIP-Salz selbst die Insulinsekretion stimuliert, wenn man es in Gegenwart einer substimulatorischen Glucosekonzentration (5,6 mM) bzw. in Gegenwart einer Glucosekonzentration, die noch keine maximal stimulierende Wirkung entfaltet (11,2 mM), inkubiert.

In letzterem Fall, also in Gegenwart von 11,2 mM Glucose, konnten wir keinen Effekt beobachten, die Insulinwerte wurden durch DIP-Salz nicht beeinflußt, was die Annahme Kosowers, daß Protein-SH-Gruppen, in unserem Fall Membran-SH-Gruppen, durch Azoester kaum beeinflußt werden, zumindest für höhere Glucosekonzentrationen bestätigen dürfte. In Gegenwart einer Glucosekonzentration von 1 mg/ml war dagegen bei einer Konzentration von 0,5 mM DIP+2 ein, wenn auch geringer, so doch statistisch signifikanter Anstieg der Insulinsekretion zu verzeichnen (Abb. 22, Tab. 12). Dies spricht dafür, daß, ähnlich wie bei p-CMB, DTNB und JAA, auch im Falle von DIF-Salz eine Wechselwirkung von Reagenz mit Membran-SH-Gruppen zur Sekretion von Insulin führt, vorausgesetzt, eine solche Interaktion findet tatsächlich statt, denn direkt als solche gemessen wurde sie ja nicht. Daß dieser Effekt bei DIP in Gegenwart von 5,6 mM

Glucose nicht auftrat (Abb. 23, Tab. 13), erklärt sich aus der Tatsache, daß DIP den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten senkt und damit vermutlich auch die mit diesem in Zusammenhang stehenden Membran-SH-Gruppen.

Die Tatsache, daß der stimulierende Effekt von DIP-Salz in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose gering war im Vergleich zu äquimolaren Mengen anderer Stimulantien, könnte damit begründet werden, daß nur sterisch besonders günstig lokalisierte, gut zugängliche Membran-SH-Gruppen oxidiert wurden. Bei höherer Konzentration (1,0 mM DIP-Salz) sank die Insulinsekretion wieder leicht, dies kann wiederum dadurch verursacht sein, daß eine geringe Permeation nach 60 Minuten bei dieser Konzentration nicht auszuschließen ist.

Weniger erwartete Resultate erhielten wir bei den Untersuchungen der Auswirkungen von DIP und DIP-Salz auf die p-CMB induzierte Insulinsekretion. Wie bereits festgestellt wurde, stimuliert p-CMB die Insulinsekretion wahrscheinlich dadurch, daß es mit membranständigen SH-Gruppen reversible Mercaptide bildet (61), also die Anzahl membranständiger SH-Gruppen senkt. Am Modell des isoliert perfundierten Rattenpankreas wurde gefunden, daß die membrangängige Verbindung Diamid die p-CMB-Wirkung zu hemmen vermag (31). Hinsichtlich der Methodik muß jedoch angemerkt werden, daß der hemmende Effekt von Diamid auf die durch p-CMB stimulierte Sekretion nur dann deutlich ausgeprägt war, wenn

Diamid bereits dem Präperfusat zugesetzt wurde, d.h., wenn der intrazelluläre GSH/GSSG-Quotient bereits herabgesetzt war, war keine Stimulation mit p-CMB mehr möglich.

Wir stellten nun am Modell der isolierten Langerhansschen Insel fest, daß die membrangängige Azoverbindung DIP zu einem geringen Anstieg der p-CMB induzierten Sekretion führt (Abb. 24 und Tab. 14), die nicht membrangängige Substanz DIP+2 zeigte keine Auswirkungen (Abb. 25 und Tab. 15). In beiden Fällen waren DIP bzw. DIP+2 und p-CMB von Anfang an gleichzeitig im Inkubationsmedium anwesend.

Die im Gegensatz zur Perfusion fehlende Hemmwirkung der Azoverbindung DIP auf die p-CMB induzierte Insulinsekretion ist also möglicherweise methodisch bedingt. Schwieriger ist es, eine einleuchtende Erklärung für den leicht stimulierenden Effekt der membrangängigen Substanz DIP auf die p-CMB induzierte Insulinsekretion zu finden. Eine chemische Wechselwirkung von p-CMB mit DIP und GSH war in separat durchgeführten in vitro Versuchen zumindest nicht auszuschließen, auch müssen hinsichtlich der Toxizität von p-CMB wohl doch einige Einschränkungen gemacht werden: Unter der Inkubation mit 1-5 mM p-CMB (wir verwendeten eine Konzentration von 0,5 mM) trat z.B. an roten Blutzellen eine erhöhte osmotische Fragilität auf, so daß es nicht auszuschließen ist, daß auch in der Langerhansschen Insel oberflächliche ß-Zellen in Mitleidenschaft gezogen worden sind und der Sekretionsanstieg mit einer solchen Läsion erklärt werden könnte (81).

Die unterschiedliche Wirkung von DIP und DIP-Salz sowohl auf den GSH/GSSG-Quotienten als auch auf die Glucose induzierte Insulinsekretion deuten darauf hin, daß dem intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten eine Bedeutung beim Sekretionsmechanismus zukommt. Es wäre denkbar, daß über den Redoxzustand des GSH/GSSG-Systems (der wiederum von Glucosekonzentration, PPS und NADPH/NADP-Quotient abhängt), das Redoxgleichgewicht membranständiger SH- und S-S-Gruppen moduliert wird, daß also aus dem Zellinneren Reduktionsäquivalente an die Zellmembran geliefert werden. Durch die Verlagerung des Reduktions-Oxidations-Gleichgewichtes zwischen freien SH-Gruppen und Disulfidbrücken in der Plasmamembran zur reduzierten Seite hin könnten sterische Veränderungen der Membranstruktur (Spaltung von Disulfidbrücken in Rezeptorproteinen?) hervorgerufen werden, die veränderte Ionenpermeabilitäten zur Folge haben. Da einerseits bei Calcium-Mangel die durch Glucose und Thiolreagenzien hervorgerufene Sekretion herabgesetzt ist (82), andererseits die Calciumnettoaufnahme in die Pankreasinsel bei Erkennung eines physiologischen Stimulus gesteigert ist, es also zu einem stärkeren Einstrom von Calcium in die ß-Zelle kommt (83), wurde die Vermutung geäußert, daß den Wechselwirkungen von Ca^{++} mit anderen Ionen (v.a. Na^{+}) ebenfalls eine regulierende Funktion zukommt. Auch Matthews und Deans haben in elektrophysiologischen Versuchen gemessen, daß Stimulatoren der Insulinsekretion zu Änderungen von Ionenflüssen führen, wodurch der Sekretionsmechanismus aktiviert

wird (84). Untersuchungen über direkte Beziehungen zwischen Membran-SH-Gruppen und Ionenflüssen stehen allerdings noch aus.

4.2 Leucin und GSH/GSSG-Quotient

Mehrere Autoren berichteten, daß Aminosäuren eine stimulierende Wirkung auf die Insulinsekretion ausüben. Milner, Basabe und Panten haben in vitro einen Anstieg der Insulinsekretion nach Zusatz von Leucin gesehen (21,23,27). Über den Mechanismus der insulinfreisetzenden Wirkung von Leucin ist bis jetzt erst wenig bekannt.

Die schwedische Arbeitsgruppe um Hellman hat nachgewiesen, daß Leucin in der ß-Zelle metabolisiert wird und schreibt den Abbauprodukten eine Wirkung beim Sekretionsmechanismus zu (26). Von verschiedener Seite wurde auch auf die Bedeutung des c-AMP-Systems hingewiesen, so steigt der c-AMP-Spiegel in Inselzellen nach Zusatz von Leucin (85); Leucin und Theophyllin (ein Hemmstoff der Phosphodiesterase) verstärken sich gegenseitig in ihrer Wirkung (86).

In der Einleitung haben wir bereits erläutert, daß auch reduzierte Pyridinnucleotide bei der Leucin induzierten Insulinsekretion eine Rolle spielen können. Ausgehend von der Beobachtung von Panten et al., die gesehen hatten, daß die Fluoreszenz reduzierter Pyridinnucleotide (87) in Gegenwart von Leucin zunimmt, untersuchten Ammon und Hoppe den insu-

lären NADPH/NADP-Quotienten bei Anwesenheit von Leucin im Inkubationsmedium und fanden einen signifikanten Anstieg des NADPH und ein Absinken von NADP (30).

Der mögliche Zusammenhang des NADPH/NADP-Systems mit dem GSH/GSSG-System wurde bereits diskutiert. In unserem Arbeitskreis wurde weiter festgestellt, daß bei einer experimentellen Senkung des insulären GSH-Gehalts durch Diamid, Methylenblau oder t-BHP auch die Leucin induzierte Insulinsekretion gehemmt ist (32). Daraus kann zumindest geschlossen werden, daß der GSH/GSSG-Quotient für die durch Leucin stimulierte Insulinsekretion von Bedeutung ist. Diese Bedeutung könnte darin liegen, daß durch Leucin über die bereits beschriebene Steigerung des NADPH/NADP-Quotienten ein Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten erfolgt, der seinerseits für die insulinfreisetzende Wirkung des Insulins verantwortlich sein könnte. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der insuläre GSH- und GSSG-Gehalt in Gegenwart von 10 mM Leucin, kombiniert mit 5,6 mM Glucose (bei diesen Konzentrationen war die Leucinwirkung bezüglich der Steigerung des NADPH/NADP-Quotienten am effektivsten (88)), bestimmt. Abb. 26 und Tab. 16 zeigen, daß Leucin den GSH-Spiegel signifikant erhöht, GSSG wird herabgesetzt. Diese Befunde sprechen für die Vermutung, daß der insulinfreisetzende Effekt des Leucins zumindest teilweise mit GSH in Zusammenhang steht, indem es über NADPH reduziertes Glutathion liefert.

Was die Bedeutung des NADPH und des GSH für die Insulin-

sekretion angeht, so bestehen offensichtlich Ähnlichkeiten zwischen Leucin und Glucose, da beide sowohl zur Zunahme des NADPH als auch zum Anstieg des GSH führen und beide ihre Insulin freisetzende Wirkung verlieren, wenn man intrazelluläres NADPH oder GSH herabsetzt. Die Frage, ob die Reduktionsäquivalente für NADPH und GSH auch im Falle von Leucin via PPS geliefert werden (bei der Glucose induzierten Insulinsekretion konnte dies ja wahrscheinlich gemacht werden (5,6)), kann dagegen nicht schlüssig beantwortet werden. Während bei zunehmender Glucosekonzentration ein Anstieg von 6-Phosphogluconat als Ausdruck einer erhöhten Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und damit des PPS zu finden ist (89,90), konnte diese Beobachtung für Leucin nicht bestätigt werden (88). Auch direkte Bestimmungen des PPS nach der Methode von Katz und Wood (91) (Messung der Bildung von $^{14}CO_2$ und THO aus 1-^{14}C und 6-^{14}C sowie 5-^{3}H Glucose) ergaben im Gegensatz zu Glucose (5) keine Hinweise auf eine gesteigerte Aktivität des PPS in Gegenwart von Leucin (92).

Es wäre denkbar, daß Glucose und Leucin das Signal zur Insulinfreisetzung auf unterschiedliche Weise geben, jedoch über einen gemeinsamen Abschnitt in der Sequenz der Ereignisse verfügen, die zur Sekretion führen, der im Bereich des NADPH/GSH liegt.

4.3. Alter und GSH/GSSG - Quotient

Die Bemühungen, Ätiologie und Pathogenese des Altersdiabetes besser zu verstehen, sind bisher nur insofern erfolgreich gewesen, als man festgestellt hat, daß oft eine erbliche komponente und verschiedene exogene, insulinunabhängige Faktoren (u.a. Stress, Adipositas und Infekte) beteiligt sind. Es besteht keineswegs immer ein absoluter Insulinmangel, die diabetische Stoffwechselstörung beruht vielmehr meist auf einer Veränderung des Gleichgewichts zwischen Insulinproduktion und den Faktoren, die Wirkung und Bedarf des Insulins beeinflussen, ohne daß bis heute die formale und kausale Pathogenese des Altersdiabetes hinreichend geklärt ist.

Untersuchungen mit dem Ziel, pathogenetische Faktoren des Altersdiabetes im Tierexperiment auf biochemischer Grundlage zu klären, haben einige Hinweise erbracht: Es wurde gezeigt, daß Pankreasinseln 2 Jahre alter Mäuse bzw. Ratten auf den gleichen Glucosereiz hin weniger Insulin sezernieren als junge Tiere (36,35,34). Auf eine mögliche Bedeutung des intrazellulären NADPH-Gehalts wies Ammon 1974 hin; er sah, daß bei Abwesenheit von Glucose der NADPH-Spiegel in alten und jungen Tieren gleich ist. Bei Zusatz von Glucose nimmt der NADPH-Gehalt bei den Inseln junger Tiere zu, bei alten Tieren dagegen nicht. Bei alten Tieren war auch die Glucoseoxidation - und damit vermutlich auch der PPS - herabgesetzt (35).

Auffällig ist die Parallelität dieser Befunde zu den Untersuchungen des Glutathionstoffwechsels in den Inseln alter und junger Ratten in der vorliegenden Arbeit. Sowohl bei der Stimulation mit Glucose als auch bei der Leucin induzierten Sekretion antworteten nur die Inseln junger Tiere mit einem Anstieg von reduziertem und einem Abfall von oxidiertem Glutathion. Während jedoch Ammon 1974 in Abwesenheit von Glucose keinen Unterschied im NADPH-Gehalt junger und alter Mäuseinseln gemessen hatte, wurde hier gefunden, daß der GSH-Gehalt der Inseln alter Tiere in Gegenwart einer substimulatorischen Glucosekonzentration (5,6 mM) leicht, wenngleich nicht signifikant erhöht war.

Der Gesamtglutathiongehalt von Inseln alter und junger Tiere war nicht verändert, was in Einklang steht mit früheren Befunden von Ammon (35) und Coddling et al. (36) sowie neueren Untersuchungen in diesem Labor, die auch keinen Unterschied im Insulingehalt von Pankreasinseln alter und junger Tiere erkennen ließen.

Diese Daten unterstützen die Vermutung, daß die altersphysiologischen Veränderungen der Insulinsekretion nicht die Folge eines verminderten Gehalts der ß-Zelle an Insulin sind oder auf einer verminderten Synthese aus Proinsulin oder einem Mangel an für die Sekretion wichtigen Metaboliten beruhen. Es wäre vielmehr denkbar, daß die im Alter herabgesetzte Empfindlichkeit, mit der die ß-Zelle auf einen Stimulus der Insulinsekretion reagiert, in Zusammenhang

steht mit einer Einschränkung des Glucosestoffwechsels via PPS ⟶ , NADPH ⟶ , GSH ⟶ Membran-SH, so daß der Reiz zur Insulinfreisetzung nicht in genügendem Ausmaß oder nicht schnell genug beantwortet wird.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurden Untersuchungen zur Bedeutung des intrazellulären reduzierten Glutathions für die durch Glucose und Leucin stimulierte Sekretion von Insulin angestellt.

5.1

a) Durch Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid)(DIP), einer Substanz, die die Cytoplasmamembran der Pankreasinsel permeiert, wurde der intrazelluläre GSH/GSSG-Quotient herabgesetzt und die durch Glucose induzierbare Insulinsekretion gehemmt.

b) DIP-Salz, das aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften die Plasmamembran nicht permeieren kann, führte weder zu einer deutlichen Senkung des GSH/GSSG-Quotienten, noch zur Hemmung der Glucose induzierten Insulinsekretion.

c) Diese Befunde zeigen, daß nur diejenige DIP-Verbindung die Glucose induzierte Insulinsekretion hemmt, die auch den intrazellulären GSH/GSSG-Quotienten senkt. Dies läßt darauf schließen, daß dieser Quotient eine Bedeutung im Mechanismus der Glucose induzierten Insulinsekretion besitzt.

d) 0,5 mM DIP-Salz führt in Anwesenheit einer nicht stimulierenden Glucosekonzentration zu einer leichten Sekretion

von Insulin, DIP hat einen solchen Effekt nicht.

e) Die Tatsache, daß durch die nicht membrangängige Substanz DIP-Salz eine Insulinsekretion in Gegenwart einer substimulatorischen Glucosemenge ausgelöst werden kann, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß DIP-Salz, wie verschiedene andere Thiolreagenzien, die die Sekretion von Insulin stimulieren, mit SH-Gruppen auf der Plasmamembran der ß-Zelle reagiert. Daß DIP diese Wirkung nicht zeigt, erklärt sich vermutlich dadurch, daß dieses die Anzahl freier SH-Gruppen auf der Membran der ß-Zelle, deren Vorhandensein Voraussetzung für eine Stimulierung der Sekretion ist, durch Senkung des intrazellulären GSH herabsetzt.

5.2

a) Leucin führte in einer Konzentration von 10 mM in Gegenwart von 5,6 mM Glucose zu einem signifikanten Anstieg von reduziertem Glutathion, gleichzeitig sank der Gehalt der Ratteninsel an GSSG. Daraus errechnete sich ein Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten, der Gesamtglutathiongehalt blieb unverändert.

b) Aufgrund dieser Befunde und der einschlägigen Literatur ist es denkbar, daß die durch Leucin stimulierbare Insulinsekretion in einem Zusammenhang mit dem Anstieg des GSH/

GSSG-Quotienten zu sehen ist.

5.3

a) Bei Inseln 2 Jahre alter Ratten führten weder Glucose noch Leucin zu einer signifikanten Zunahme des GSH bzw. des GSH/GSSG-Quotienten.

b) Es wird daher die Möglichkeit diskutiert, daß bei Inseln alter Tiere die verminderte Ansprechbarkeit auf einen Sekretionsreiz die Folge einer altersbedingten Abnahme des Stoffwechselweges der Glucose über den PPS und einer damit einhergehenden herabgesetzten Bildung von NADPH und GSH darstellt.

Literaturverzeichnis

1. Montague, W., Taylor, K.W.:
The role of Pentose Phosphate Pathway in Insulin Secretion.
in: the Structure and metabolism of Pancreatic Islets.
(Falkmer, S., Hellman, B., Täjedahl, I.-B. eds.)
Pergamon Press, Oxford, pp. 263 - 274 (1970)

2. Heinze, E. and Steinke, J.:
Glucose metabolism of isolated pancreatic islets:
Difference between fetal, newborn and adult rats.
Endocrin. 88, 1259 - 1263 (1971)

3. Ammon, H.P.T. and Steinke, J.:
6 - Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in rats.
Diabetes 21, 143 - 148 (1972)

4. Verspohl, E., Händel, M., Ammon, H.P.T.:
Effect of anti-Insulin-Serum on Pentose-Phosphate-Shunt (PPS) in Rat Islets of Langerhans
Abstracts of the 18. Spring meeting of the Dt. Pharmakologische Gesellschaft, March 16th-18th 1977, Mainz

5. Ammon, H.P.T., Verspohl, E. and Händel, M.:
Pentose Phosphate Shunt activity of pancreatic islets depends on glucose concentration.
Diabetologia 13, 377, Abstract (1977)

6. Ammon, H.P.T. and Verspohl, E.:
Pyridine Nucleotides in Pancreatic Islets During Inhibition of Insulin Release by Exogenous Insulin.
Endocrin. 99, 1469-1476 (1976)

7. Ammon, H.P.T.:
Effect of Glucose and methylenblue (MB) on NADP, NADPH and Insulin secretion of isolated pancreatic rat islets.
Arch. Pharmacol. 272, Suppl. R1 (Abstract) (1973)

8. Ammon, H.P.T., Wagner-Teschner, D., Grimm, A. and Niklas, H.:
Relationship between NADPH, glutathione and glucose-induced insulin secretion in pancreatic rat islets.
Venezia joint meeting of german and italian pharmacologists, Abstract p 314 (1977)

9. Kosower, N.S., Song, K.-R., Kosower, E.M.:
Glutathione III. Biological Aspects for the Azoester Procedure for Oxidation within the Normal Human Erythrocyte.
Biochem. Biophys. Acta 192, 15 (1969)

10. Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B.:
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of Glutathione to the Disulfide.
Biophys. Biochem. Res. Comm. 37, 593-596 (1969)

11. Kosower, E.M., Correa, W., Kinon, B.J. and Kosower, N.:
Glutathione VII.: Differentiation among Substrates by the thioloxidizing agent, diamide.
Biochem. Biophys. acta 264, 39-44 (1972)

12. Brown, J.S.:
Oxidation of reduced Nicotinamide nucleotides by diamide.
Biochem. J. 124, 665-667 (1971)

13. Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H. and Hegner, D.:
Inhibition of p-Chloromercuribenzoate- and glucose induced Insulin release in vitro by methylenblue, Diamide and tert-Butylhydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598-605 (1977)

14. Ammon, H.P.T. and Grimm, A.:
Glutathion und Insulinsekretion: Mikromethoden zur Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Langerhansschen Inseln, Beziehungen zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion.
Dissertation Grimm, Tübingen 1978

15. Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic ß-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J. 129, 241-254 (1972)

16. Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C. and Beutler, E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes: organic hydro-peroxides.
Biochem. J. 139, (1974)

17. Sies, C., Gerstenecker, C., Menzel, H. and Flohe, L.:
Oxidation in the NADP-System and release of GSSG from Hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
FEBS Lett. 27, 171-175 (1972)

18. Kosower, E.M., Kosower, N.S., Kanety-Londner, H. and Levi, L.:
Glutathione IX: New thiol-oxidizing agents, DIP, DIP+1 and DIP+2.
Biochem. Biophys. Res. Comm. Vol 59, No. 1 1974

19. Fajans, S.S., Floyd, Jr., J.C., Knopf, R.F., Pek, S., Weissman, P. and Conn, J.W.:
Amino acids and insulin release in vivo.
Israel J. Med. Sci. 8, 233-243 (1972)

20. Floyd, Jr., J.C., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F. and Rull, J.:
Stimulation of insulin secretion by amino acids.
J. Clin. Invest. 45, 1487 (1966)

21. Milner, R.D.G.:
The mechanism by which Leucine and Arginine stimulate insulin secretion.
Biochem. Biophys. Acta 192, 154-156 (1969)

22. Lambert, A.E., Jenrenaud, B., Junod, A. and Renold, A.E.:
Insulin release induced by amino acids.
Biochem. Biophys. Acta 174, 540-553 (1969)

23. Basabe, J.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K. and Wolff, F.W.:
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas.
Diabetes 20, 449-456 (1971)

24. Levin, S.R., Grodsky, G.M., Hagura, R., Smith, D.F. and Forsham, P.H.:
Relationship between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated perfused rat pancreas.
Endocrin. 90, 624-631 (1972)

25. Malaisse, W., Malaisse-Lagae, F.:
Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites.
J. Lab. and Clin. Med. 72, 438-448 (1968)

26. Hellman, B., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids

in micro-dissected islets.
Biochem. J. 123, 513-521 (1971)

27. Panten, U., Kriegstein, E.v., Poser, W., Schönborn, J. and Hasselblatt, A.:
Effects of L-Leucine and α-Ketoisocapronic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets.
FEBS Letters 20, 225-228 (1972)

28. Goberna, R., Tamarit, Jr. J., Osorio, J., Fussgänger, J., Tamarit, J. and Pfeiffer, E.F.:
Action of ß-hydroxybutyrate, acatoacatate and palmitate on the insulin release in the perfused isolated rat pancreas.
Horm. Met. Res. 6, 256-260 (1974)

29. Gylfe, E. and Sehlin, J.:
Interaction between the metabolism of L-Leucine and D-Glucose in the pancreatic ß-cells.
Horm. Met. Res. 8, 7-11 (1976)

30. Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S. and Niklas, H.:
Effect of Leucine on Islet Pyridine Nucleotide Contents and Insulin Release, in vitro Interactions with methylen-blue, Thiol oxidants and p-Chloromercuribenzoate.
Diabetes, im Druck

31. Akhtar, M.S.:
Untersuchungen zum Mechanismus der Insulinsekretion: Bedeutung von Thiol-Gruppen in der ß-Zelle der Langerhansschen Insel für die Freisetzung von Insulin und ihre mögliche Bedeutung zum Mechanismus der Feedback-Hemmung der Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen 1977

32. Niklas, H.:
Einfluß von Methylenblau, Diamid und t-Butylhydroperoxid auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhansschen Inseln des Rattenpankreas. Ein Beitrag zur Erkennung der Bedeutung von NADPH und reduziertem Glutathion für den Sekretionsmechanismus.
Dissertation Tübingen 1978

33. Händel, M.:
Pentosephosphatshunt Langerhansscher Inseln und Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen 1978

34. Hajdu, A., Herr, F., Rona, G.:
Functional Significance of a Spontaneous Pancreatic Islet Change in Aged Rats.
Diabetologia 4, 44-47 (1968)

35. Ammon, H.P.T.:
Der Einfluß des Alters auf Glucoseoxidation und Pyridin-

nucleotide der Langerhansschen Insel.
Akt. Geront. 4, 755-757 (1974)

36. Coddling, J.A., Kalnius, A. and Haist, R.E.:
Effects of age and of fasting on the responsiveness of the Insulin secreting mechanism of the Islets of Langerhans to Glucose.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 53, 716-725 (1974)

37. Ammon, H.P.T. und Hoppe, E.:
Unveröffentlichte Daten

38. Kosower, E.M. and Kanety-Londner, H.:
Glutathione XIII.: Mechanism of Thiol-Oxidation by diazenedicarboxylic acid derivatives.
Journ. Am. Chem. Soc. 98, 3001-3007,(1976)

39. Umbreit, W.W., Burris, R.H. and Stauffer, J.P.:
manometric and biochemical techniques.
5th edition, Burgers Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, USA, p 146 (1972)

40. Lacy, P.E. and Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39 (1967)

41. Soeldner, J.S. and Slone, D.:
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody-technique.
Diabetes 14, 771-779 (1965)

42. Cohn, V.H. and Lyle, J.:
A Fluorimetric assay for glutathione.
Anal. Biochem. 14, 434-440 (1966)

43. Hissin, P.J. and Hilf, R.:
A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced Glutathione in Tissues.
Anal. Biochem. 74, 214-226 (1976)

44. Tietze, F.:
Enzymatic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione.
Anal. Biochem. 27, 502-522 (1969)

45. Beutler, E. und West, C.:
Comment Concerning a Fluorimetric Assay for Glutathione.
Anal. Biochem. 81, 458-460 (1977)

46. Ashcroft, S.J.H. and Randle, P.J.:
Enzymes of Glucose Metabolism in Normal Mouse Pancreatic Islets.
Biochem. J. 119, 5-15 (1970)

47. Meister, A.:
Biosynthesis and utilization of glutathione; the γ-glutamyl cycle and its function in amino acid transport.
In: Glutathione: Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart p 69-77 (1974)

48. Kosower, E.M.:
A role for glutathione in muscle contraction.
Experientia 26, 760 (1970)

49. Bartels-Bernal, E., Rosenberry, T.L., Chang, H.W.:
A membrane activation cycle by sulfhydryl reagents after affinity labeling of the acetylcholine receptor of electroplax.
Mol. Pharmacol. 12, 813-819 (1976)

50. Barnes, M.M., James, S.P., Wood, P.B.:
The formation of mercapturic acid. 1. Formation of mercapturic acid and the levels of glutathione in tissues.
Biochem. J. 71, 680 (1959)

51. Chasseaud, L.F.:
Conjugation with Glutathione and mercapturic acid

In: Glutathione: Metabolism and function.
Edited by Arias, I.M., Jakoby, W.B. p77-114 (1976)

52. Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
Effect of GSSG on protein synthesis.
In: Glutathione, p. 276, Edits.: Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller , H.D., Wendel, A. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974

53. Kosower, N.S., Vanderhoff, G.A., Kosower, E.M.:
Glutathione VIII.: The effects of glutathione disulfide on initiation of protein synthesis.
Biochem. Biophys. Acta 272, 623 (1972)

54. Mannervik, B., Eriksson, S.A.:
Enzymatic reduction of mixed disulfides and Thiosulfate Esters.
In: Glutathione: Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds.). Georg Thieme Publishers, Stuttgart p 120-131 (1974)

55. Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
Functional Aspects of Glutathione Disulfide and Hidden Forms of Glutathione.
In: Glutathione: Metabolism and Function.

(Arias, J.M., Jakoby, W.B. eds). Raven Press New York p 159-174 (1976)

56. Epstein, D.L.:
Introduction to discussion of lens and red cell membrane sulfhydryl groups.
Exp. Eye Res. 11, 351-355 (1971)

57. Malbica, J.O.:
The effect of N,N,N',N'-tetramethylazoformamid (TMAF) on lysosomal stability in the presence and absence of anti-inflammatory agents.
B.B.R.C. 44, 1457-1463 (1971)

58. Siliprandi, D., Soutari, G., Zoccarato, F., Siliprandi,N.:
Action of "Diamide" on some energy linked processes of rat liver mitochondria.
FEBS Lett. 42, 197-199 (1974)

59. Allen, D.W., Jandl, J.H.:
Oxidative haemolysis and precipitation of hemoglobin. II. Role of thiols in oxidant drug action.
J. Clin. Invest. 40, 454 (1961)

60. Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J., Matschinsky, F.M.:
Iodoacetate and Iodoacetamide-induced alterations of pancreatic- and ß-cell responses.
Endocrin. 97, 698-708 (1975)

61. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
Membrane Sulfydryl Groups and the pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues.
In: Diabetes (Malaisse, W.J., Pirart, J. eds.).
pp 65-78, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam (1974)

62. Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedahl, I.-B.:
Role of Thiol Groups in Insulin Release: Studies with poorly permeating Disulphides.
Mol. Pharmacol. 9, 792-801 (1973)

63. Grasetti, D.R.:
Some biochemical effects of thione forming disulfides and their use in the study of cell thiols.
Ann. 1st Sup. Sanità, 5, 645-651 (1969)

64. Grasetti, D.R. and Murray Jr. J.F.:
Modification of external sulfhydryl groups in Ehrlich ascites tumor cells with 6,6'-dithiodinicotinic acid.
Biochem. Pharmacology 19, 1836-1838 (1970)

65. Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. II. Site of action of tolbutamide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1384-1388 (1971)

66. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mahy, M., Brisson, G.R.:
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. VIII. Combined effects of glucose and sulfonylureas.
Europ. J. clin. Invest. 2, 85-90 (1972)

67. Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.B.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues. II. Site of action of tolbutamide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1384-1388 (1971)

68. Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Grimm, A. and Niklas, H.:
Effect of Methylenblue and Thiol Oxidants on Pancreatic Islet GSH/GSSG-Ratios and Tolbutamide Mediated Insulin Release in vitro.
Naunyn and Schmiedebergs Arch. Pharmacol. in press

69. Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedahl, I.B.:
Jodoacetamide induced sensitization of the pancreatic ß-cells to glucose stimulation.
Biochem. J. 132, 775 (1973)

70. Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Täljedahl, I.-B. and Thomas, E.W.:
The pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues XII. Insulin release in response to

halogenated Hexosamines.
Mol. Pharmacol. 12, 208-216 (1975)

71. Wax, R., Rosenberg, E., Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
The effect of the thiol-oxidizing agent, diamide, on the growth of Escherichia Coli.
J. Bacteriol. 101, 1092 (1970)

72. Zehavi-Willner, T., Kosower, E.M., Hunt, T., Kosower, N.S.:
Glutathione V.: The effects of the thiol-oxidizing agent diamide on initiation and translation in rabbit reticulocytes.
Biochem. Biophys. Acta 228, 245 (1971)

73. Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
Protection of membranes by glutathione.
In: Glutathione p. 216. Edits.: Flohé, L., Benöhr, H. Ch., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. Georg-Thieme-Verlag Stuttgart (1974)

74. Kosower, N.S., Song, K.R. and Kosower, E.M.:
Glutathione IV.: Intracellular oxidation and membrane injury.
Biochem. Biophys. Acta 192, 23 (1969)

75. Srivastava, S.K. and Beutler, E.:
The transport of oxidized glutathione from human

erythrocytes.
J. Biol. Chem. 244, 9 (1969)

76. Sies, H., Gerstenecker, C., Summer, K.H., Menzel, H. and Flohé, L.:
Glutathione dependent hydroperoxide metabolism and associated metabolic transitions in hemoglobin-free perfused rat liver.
In: Glutathione p. 261. Edits.: Flohé, Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974)

77. Srivastava, S.K. and Beutler, E.:
The transport of oxidized glutathione from the erythrocytes of various species in the presence of chromate.
Biochem. Journal 114, 833 (1969)

78. Beutler, E. and Srivastava, S.K.:
GSH metabolism of the lens.
In: Glutathione p. 201, Edits.: Flohé, Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D., Wendel, A. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974)

79. Jackson, R.C., Harrap, K.R., Smith, C.A.:
Binding of glutathione and cystein to cellular protein by mixed disulphide bonds.
Biochem. J. 110, 37 (1969)

80. Modig, H.:
Cellular mixed disulphides between thiols and proteins and other possible implications for radiation protection.
Biochem. Pharmacol. 17, 177 (1968)

81. Jacob, H.S. and Jandl, J.H.:
Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells.
I. Mechanisms of hemolysis
J. Clin. Invest. 41, 779 (1962)

82. Hellman, B., Sehlin, J. and Täljedahl, I.B.:
Effects of Glucose on $^{45}Ca^{++}$ uptake by pancreatic islets as studied with the Lanthanum Method.
J. Physiol. 254, 639 (1976)

83. Milner, R.D.G and Halls, C.N.:
in "The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets" (S. Falkmer, B. Hellman and I.-B.Täljedahl eds.) pp 489-493, Peyamon Press, Oxford 1970

84. Matthews, E.K. and Dean, P.M.:
Electrical activity in islet cells.
In: The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets (Falkmer, S., Hellman, B. and Täljedahl, I.-B. eds.) Pergamon Pres, Oxford 2, 305-313 (1970)

85. Charles, M.A., Lawecki, J. and Grodsky, G.M.:
Cyclic AMP in pancreatic islets.
Diabetes 22 Suppl. 1, 297 (1973)

86. Selawry, H., Marcks, C., Fink, G., Lavine, R., Cresto, J. and Recant, L.:
A mechanism for glucose-induced insulin release.
Diabetes 22 Suppl. 1, 295 (1973)

87. Panten, U., Christians, J., Kriegstein, E.v., Poser, W. and Hasselblatt, A.:
Studies of the mechanism of L-leucine and α-KIC-induced insulin release from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 10, 149-154 (1974)

88. Hoppe, E.:
Einfluss von Leucin und Arginin auf die Sekretion von Insulin sowie den NADPH/NADP-Quotienten und den NADH/NAD-Quotienten Langerhansscher Inseln.
Dissertation Hoppe, Tübingen 1978

89. Montague, W. and Taylor, K.W.:
Islet-cell metabolism during insulin release:
Effects of glucose, octanoate, tolbutamide, glucagon and theophylline.
Biochem. J. 115, 257-262 (1969)

90. Akhtar, M.S., Verspohl, E., Hegner, D. and Ammon, H.P.T.:
6-Phosphogluconate/glucose-6-phosphate ratio in rat pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Diabetes 26, No 9, 857-863 (1977)

91. Katz, J. and Wood, H.G.:
The use of ^{14}C-Glucose for the evaluation of the pathways of glucose metabolism.
The J. of Biolog. Chemistry 235, 2165-2177 (1960)

92. Ammon, H.P.T. und Amm, U.:
Unveröffentlichte Daten

Lebenslauf

Am 6. August 1953 wurde ich, Roslindis Eujen, geb. Schielein, als Tochter des Apothekerehepaares Felix und Erika Schielein in Nürnberg geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1959 bis 1963 in Georgensgmünd und Nürnberg. Im September 1963 trat ich in das Willstätter-Gymnasium (vorm. Realgymnasium) Nürnberg ein, an dem ich im Mai 1972 die Reifeprüfung ablegte. Im Oktober 1972 begann ich mit dem Pharmaziestudium an der Universität Tübingen. Den 1. Prüfungsabschnitt bestand ich im September 1974, den 2. Teil der pharmazeutischen Prüfung legte ich im März 1976 ab. Vom 15. März bis 15. September 1976 war ich als Pharmazie-Praktikantin in der St.-Georgs-Apotheke, Georgensgmünd tätig. Seit Oktober 1976 war ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. med. H.P.T. Ammon beschäftigt.
Nach Bestehen des 3. Prüfungsabschnitts im April 1977, erhielt ich im Mai 1977 die Approbation als Apothekerin. Von Oktober 1976 bis Februar 1978 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut tätig.
Am 15.10.1977 heiratete ich Herrn Apotheker Dr.Enno Eujen.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon (Pharmakologie) waren die Herren Professoren H. Auterhoff und K.-A. Kovar (Pharm. Chemie), E. Graf (Pharm. Technologie), E. Reinhard (Pharm. Biologie), R.E. Bader (Bakteriologie und Hygiene), E. Müller und W. Rüdorff (Chemie), H. Seiler (Physik) und M. Siess (Pharmakologie).

Bönecke-Druck 3392-Clausthal-Z. 29